

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

【食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に  
関する研究】

令和 2 年度  
総括・分担報告書

■研究代表者

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 渡辺 卓穂

■研究分担者

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 渡辺 卓穂  
埼玉県衛生研究所 石井 里枝  
地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 村上 太郎  
茨城大学 鎗田 孝  
国立研究開発法人産業技術総合研究所 大竹 貴光

令和 3 年(2021 年)5 月

## 目 次

I.	総括研究報告書	
	食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究	1
	渡辺 卓穂	
II.	研究分担報告	
1.	外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究	15
	渡辺 卓穂	
1.1	スプレードライヤを用いた残留農薬用試料の開発	15
1.2	器具・容器包装の原材料の材質別規格に関する調査試料作製検討	40
1.3	特定原材料検査（乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ	54
1.4	微生物調査試料添加菌濃度の低減に関する検討	98
2.	微生物定性試験における検出下限値の推定及び食品添加物試験法の 妥当性評価法に関する研究	115
	石井 里枝	
3.	アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究	130
	村上 太郎	
4.	下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究	146
	鎗田 孝	
5.	分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用	159
	大竹 貴光	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	170

令和2年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 渡辺 卓穂 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 部長

研究要旨

輸入食品や国内食品の流通段階で健康危害リスクを及ぼすような種々の有害物質等を監視するために、行政検査は国民の食生活の安全を担保している。検査において、誤判定を避けるために、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。現在、食品の輸出の促進と輸入の増加により、誤判定の回避は輸出入国間での係争を回避するためにも重要である。これまで我々は、検査の信頼性を確保するために外部精度管理調査を検査施設に提供しており、ISO/IEC 17043認定取得をできたことで国際的にも認められた技能試験提供者となった。この外部精度管理調査（技能試験）を継続的に検査施設に提供することで、各検査機関の検査結果において信頼性の維持に寄与することができる。外部精度管理プログラムは、検査されているすべての項目に対して開発されていることが理想であるが、調査試料作製の困難さから、一部の検査項目についてしか開発されていない。新規の外部精度管理調査の開発を困難にしている要因は試料の安定性や均質性を担保することの技術的課題にある。本研究では、外部精度管理調査プログラムの改善と開発を目的に、これまで、均質で安定な外部精度管理調査試料の開発にスプレードライヤを用いることが有用であることを見出した。そこで、今年度は、1. 外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究（渡辺研究分担）では、スプレードライヤの検討及び器具・容器包装の検査項目の基礎検討を、2. 微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物の妥当性評価に関する研究（石井研究分担）では、E. coli定性試験法についてLODの推定を試みた。また、6種の食品添加物試験法について、真度、併行精度及び室内精度等を測定し、妥当性評価の対象とすべき食品について考察した。3. アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究（村上研究分担）では、分析法の改良を、4. 下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究（鎗田研究分担）では、検査試料の調製法の検討を、5. 分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用（大竹研究分担）では、課題1で作製した試料をIDMSを用いて分析値を付与し、5課題を実施した。

研究分担者名＝渡辺卓穂（（一財）食品薬品安全センター秦野研究所公益事業部長）、石井里枝（埼玉衛生研究所副所長）、村上太郎（（地独）大阪健康安全基盤研究所主任研究員）、鎗田 孝（茨城大学農学部准教授、大竹貴光（（国研）産業技術総合研究所主任研

究員)

## A. 研究目的

輸入食品や国内食品の流通段階で健康危害リスクを及ぼすような種々の有害物質等を監視するために、行政検査は国民の食生活の安全を担保している。検査において、誤判定を避けるために、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。現在、食品の輸出の促進と輸入の増加より、誤判定の回避は輸出入国間での係争を回避するためにも重要である。これまで申請者は、検査の信頼性を確保するために外部精度管理調査を検査施設に提供しており、ISO/IEC 17043 認定取得をできたことで国際的にも認められた技能試験提供者となった。この外部精度管理調査(技能試験)を継続的に検査施設に提供することで、各検査機関の検査結果において信頼性の維持に寄与することができる。

外部精度管理調査プログラムは、検査されているすべての検査項目に対して開発されていることが理想であるが、調査試料作製の困難さから、一部の検査項目についてしか開発されていない。新規の外部精度管理調査の開発を困難にしている要因は、試料の安定性や均質性を担保することの技術的課題にある。本研究では、外部精度管理調査プログラムの改善と開発を目的に、これまで、均質で安定な外部精度管理調査用試料の開発にスプレードライヤを用いることが有用であることを見出した。この粉体工学技術を残留農薬検査用試料作製に応用検討し、新規の基材開発を1~3年を通して行い、学術的に有用な方法を確立する。微生物学検査では、基材の改善を行い、新規の検査

項目を開発すると共に対象菌の検出下限値を掌握する。また、新たに、調査項目になかった器具・容器包装の検査項目の基礎検討を行う。さらに、食品添加物、貝毒及びアレルギー物質検査試料を検討し、開発されたこれらの調査試料は研究分担において外部精度管理調査パイロットスタディとして最終年までに実施し、実行可能性を検討する。

これらの研究は、リスク管理をより堅実なものとし、健康危害の未然防止や食品の輸出入の係争回避に直結する成果が期待でき、検査機関においては、ISO/IEC 17025 認定取得の補助となる。従って、現在の食品流通において必要かつ早急に着手すべきである。実施する5つの研究課題は、互いに密接に連携し、相互に研究成果をフィードバックし進行することが特色である。

## B. 研究方法

### 1 外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究(渡辺研究分担)

#### 1.1 スプレードライヤを用いた残留農薬検査用試料の開発:

残留農薬用試料は基材に自家製玄米粉を用い、玄米粉1kgをアセトニトリルまたはアセトニトリル/水4Lに懸濁させ、スプレードライヤに供した。作製検討に用いたスプレードライヤは大川原化工機株式会社製研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤ CL-8i を用いた。玄米粉懸濁溶液は事前に攪拌し、均一な懸濁溶液とし、原液タンクに移し、攪拌しながらペリスタポンプでアトマイザに2kg/hで送液した。アトマイザにはロータリー式を用い、ディスクはMC-50型を使用した。回転数は20000rpmに

設定した。また、入り口温度は 120℃、100℃、80℃で作製温度を検討した。得られた玄米粉はマイクロトラックベル社製マイクロトラック MT3200 を用い平均粒子径を測定した。また、得られた玄米粉はガスクロマトグラフ質量分析計で 4 種の農薬（ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン、クロルピリホス）を測定した。また、作製した玄米粉は顕微鏡下で粒子の観察を行った。

## 1.2 器具・容器包装の原材料の材質別規格に関する調査試料作製検討：

「器具・容器包装」を対象に新たな外部精度管理調査プログラムの実施を試みるべく調査試料作製の基礎的検討を行った。

まず、食品衛生法において個別規格があるプラスチックの材質ポリマーから 9 製品（PET 樹脂 2 種、発泡スチロール 2 種、ポリスチレン、ABS、AS、ポリプロピレン及びポリエチレン）について、作製上の必要要件である有機溶媒 19 種類（フェノール、1,1,2,2-テトラクロロエタン、1,2-ジクロロベンゼン、*o*-クロロフェノール、ジクロロ酢酸、ヘキサシ、アセトン、テトラヒドロフラン、ジクロロメタン、メチルシクロヘキサン、2,2,4-トリメチルペンタン、ヘプタン、キシレン、酢酸ブチル、クロロホルム、シクロヘキサン、トルエン、4-メチル-2-ペンタノン及び 2-ブタノン）への溶解性を検討した。

今年度は溶解を確認できたものから、ポリスチレンペレットを試料基材に選定し、試験対象物質を全合成樹脂に共通して規定される材質試験のカドミウム及び鉛とし、溶解溶媒にジクロロメタンを用いて、作製検討を行った。添加に用いる標準品は有機溶

媒に溶解する SPEX 製カドミウム及び鉛（いずれも 5000 µg/g、Base Oil 75）を用いた。ポリマー質量に対して 10 倍容量のジクロロメタンに、この標準品を添加して均質な溶液を調製し、これにポリマーを添加し、混合して十分にポリマーを溶解した（ポリマー溶液）。これをシート作製容器に流し入れ、垂平に保ちながらジクロロメタンを自然乾燥にて揮発し、シート状の試料を作製した。得られたシートについてカドミウム及び鉛含量を測定し、理論作製濃度（50 µg/g）への回収率及び均質性ならびに残留溶媒（ジクロロメタン）量を確認した。作製条件として、①ポリマー溶液調製（ポリマー含量）、②作製容器へのポリマー溶液分注量、③作製したシート内の均質性評価、④溶解溶媒除去条件及び⑤残留溶媒（ジクロロメタン）、カドミウム及び鉛含量について検討した。検討した作製条件により調査試料を作製し、品質評価（均質性確認）を行った。

## 1.3 特定原材料検査（乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ：

基材であるベビーフードおよび 10%精製水含有こしあんに乳タンパク質を 10 µg/g 添加した 2 種類の試料を用い、定量試験法である ELISA 法により外部精度管理調査研究を実施した。参加機関は、原則として消費者庁から提示されている 3 キット（モリナガ（カゼイン）キット、日本ハムキット、プリマハムキット）中、任意の 2 種類で測定を行うこととした。余力のある機関は、モリナガ（βLG）キットについても試験をお願いした。

回収した結果は、測定キット、試料ごとに解

析を行った。測定値についてメジアン・クリーニング (MC) を行った後、ロバスト方式により統計値を算出し、z-スコアを求めた。また、Xbar-R 管理図を用いた解析も行った。

#### 1.4 微生物調査試料添加菌濃度の低減に関する検討：

これまで運用してきた E. coli 検査、腸内細菌科菌群検査、サルモネラ属菌検査および大腸菌群検査の 4 項目において、外部精度管理事業の品質向上を目指すため、添加する微生物の濃度を「食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号、以下「公定法」という）に記載された成分規格に近い濃度まで低減した調査試料の開発を実施した。

E. coli 検査、腸内細菌科菌群検査、サルモネラ属菌検査の調査試料開発では、調査試料作製手順および採用微生物はそのままに、添加菌液の濃度を従来の 1/100 にした調査試料を用いた。大腸菌群では 6 菌種の微生物を用いて同様に作製した調査試料を用いた。調査試料は約 1 か月間、冷蔵または 22.5℃で保存し、生菌数測定および公定法に従った定性試験を実施して試験結果への影響を確認し、その妥当性を評価した。

なお、調査試料の妥当性を評価する基準は①公定法の試験操作で陽性・陰性の判定が可能であること、②実際の食品検査に近いマトリクスの基材で冷蔵保存が可能であること、③冷蔵保存で微生物の添加から 14 日以上の安定性が認められること（添加直後と添加 14 日後の差が対数値で±1.0 ポイント以内）、④冷蔵から 22.5℃（常温）に移管後も生菌数が測定可能であること（輸送時の温度上昇で急激に菌数が低下しない）、

の 4 条件とした。

#### 2 微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物試験法の妥当性に関する研究（石井研究分担）

##### 微生物定性試験法における検出下限値の推定

2 倍段階希釈した *Escherichia coli* 菌液を食品試料（オクラ、ハウレン草、エビピラフ、からあげ、生うどん、白菜の浅漬け）に接種し、E. coli 試験法を各濃度 n=6 で実施し、陽性と判定された試料数から LOD<sub>50</sub> を算出した。試験方法は、食品衛生法における食品、添加物等の規格基準に定められている冷凍食品の E. coli の試験法に準じた。LOD<sub>50</sub> の算出方法は ISO 16140-2:2016 記載されており、その引用元である Wilrich<sup>1)</sup>らの手法に準じて LOD<sub>50</sub> を推定した。

##### 食品添加物試験法の妥当性に関する研究

輸入時及び国内における令和元年度輸入食品違反事例を基に、「TBHQ」、「サイクラミン酸」、「ソルビン酸」、「二酸化硫黄及び亜硫酸塩類」の 6 種の試験法を対象として、食品添加物の使用量、試験法の特性を考慮し、妥当性評価を行うべき代表的対象食品種を選定した。CODEX 及び AOAC のガイドラインで示されている性能評価基準を参考に、評価を行った。指定添加物は基準値濃度を、指定外添加物は定量下限値濃度の 2 倍量を添加し、添加回収試験を実施し、選択性、真度、併行精度及び室内精度を算出した。

#### 3 アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究（村上研究分担）

本研究では、これまでに特定原材料（小麦・落花生）の定量で影響が確認されてきた

ポリフェノールの一種である Proanthocyanidin (PAC) を含む試料について、特定原材料を正確に定量することを目的として、分析法の改良について検討を行った。今年度は ELISA による小麦と落花生の定量について、カカオとシナモン中の夾雑物による測定阻害と試料からの回収率を評価した。回収率の低下が確認された試料については、PAC との結合能が報告されている化合物を利用して抽出法を改良した。また、各試料に適した化合物を確認後に、抽出条件を最適化した。

#### 4 下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究（鎗田研究分担）

##### 4.1 検査用試料の調製と評価

###### (1) 材料・試薬

検査用試料の調製には、ホタテガイ可食部（国内産）と、OA および DTX1 の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料（均質化済み）を用いた。

1 µg/mL OA 溶液と 1 µg/mL DTX1 溶液（いずれも溶媒はメタノール）は産業技術総合研究所から入手した。他の試薬は LC-MS 用、高速液体クロマトグラフィー用、または試薬特級を用いた。

###### (2) 調製方法

ホタテガイの可食部をブレンダーで細断し、裏ごし、得られた試料を混合した。次に、ガラス瓶 9 個に OA および DTX1 の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料 10 g と、その 9 倍量のホタテガイ可食部を加えて混合後、各瓶の内容物を合わせて混合した。これを 5 等分にした後、5g ずつプラスチック製バイアルに小分けした。

###### (3) 分析方法

調製した検査用試料中の OA と DTX1 の測定は、食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」別紙 2 の「オカダ酸群分析操作例」に準拠して行った。

##### 4.2 マトリックス効果の影響評価

###### (1) 材料・試薬

マトリックスとして、4.1 において検査用試料の原料に用いたホタテガイ可食部（国内産）と、産業技術総合研究所が 2015 年に主催した試験所間比較試験における試験試料であるホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた。他の試薬は 4.1(1) と同じである。

###### (2) ホタテガイ可食部を用いた検討用試料の調製

異なる分析前処理過程によってホタテガイ可食部を処理した E 液および C 液と、ホタテガイ可食部由来のマトリックスを含まない M 液の 3 種類の検討用試料を調製した。E 液は、ホタテガイ可食部 2 g を 4.1(3) の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理したものを、さらに濃縮およびフィルターろ過することによって得た。C 液は、ホタテガイ可食部 2 g を 4.1(3) の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理、ヘキサン洗浄および固相抽出処理したものを、さらに濃縮およびフィルターろ過することによって得た。M 液は OA と DTX1 をメタノールで希釈することにより得た。

###### (3) ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた検討用試料の調製

異なる分析前処理過程および濃度によってホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を処理した E1 液、E2 液、C1 液、C2 液と、試験

所間簡比較試料由来のマトリックスを含まない M1 液の 5 種類の検討用試料を調製した。なお、各液は OA と DTX1 含有濃度が異なる 5 種類の溶液群から構成される。

M1 液は、OA を 0、5、10、15、20 ng/mL、DTX1 を 0、16、32、48、64 ng/mL 含む 5 種類のメタノール溶液である。E1 液は、試験所間比較試料 0.5 g を 4.1(3) の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理し、2.5 mL に調整したものの一部を M1 液で置換することにより得た。E2 液は、2.5 mL に調整した E1 液の一部を 4 倍に希釈し、さらに M1 液で置換することによって得た。C1 液は、試験所間比較試料 0.5 g を 4.1(3) の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理、ヘキササン洗浄、固相抽出処理し、2.5 mL に調整したものの一部を M1 液で置換することにより得た。C2 液は、2.5 mL に調整した C1 液の一部を 4 倍に希釈し、さらに M1 液で置換することによって得た。

#### (4) LC-MS/MS 測定

(2) および (3) で調製した各液の LC-MS/MS 測定は、4.1(3) と同じ条件で行った。

### 5 分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用 (大竹研究分担)

対象農薬が検出下限以下であることを確認した、市場流通品のブランク玄米を粉砕したものを試料とし、そこに対象農薬であるクロルピリホス、ダイアジノン、フェントロチオン、マラチオンをポジティブリストの基準濃度値(クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン: 0.1 mg/kg, フェントロチオン: 0.2 mg/kg)になるように添加した。本試料を、IDMS を適用した一斉試験法および QuEChERS 法によって分析を

行い、得られた結果を解析して各分析法の正確さを精密に評価・比較した。さらに、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料 (Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C) の 3 種、温度は噴霧温度を示す) 中の対象農薬を分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

試薬は、アセトニトリル (AN)、アセトン (Ac)、トルエン (Tol)、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> は関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留農薬分析用を用いた。QuEChERS 法で用いた PSA、グラファイトカーボンブラック、C18 は Agilent Technologies 社製のものを用いた。他の試薬は試薬グレードを用い、水は超純水を用いた。

質量比混合法によって標準液を調製した。クロルピリホス-*d*<sub>10</sub>、ダイアジノン-*d*<sub>10</sub>、フェントロチオン-*d*<sub>6</sub>、マラチオン-*d*<sub>6</sub> を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液とした。アラクロールを Ac に溶解した溶液を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈してシリンジスパイク溶液を調製した。一方、クロルピリホス、ダイアジノン、フェントロチオン、マラチオンを Ac に溶解させ農薬混合溶液を調製した。さらに、農薬混合溶液、内標準溶液、アラクロール溶液、Ac を混合することにより、検量線溶液を調製した。次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体を含有しないことを確認した玄米試料を後述の前処理法によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の検量線溶液に溶解させることにより、マトリックスマッチ検量

線溶液を調製した。

分析法1(一斉試験法)では、玄米試料3gに農薬混合溶液0.4mL(添加回収試験の場合のみ)および内標準溶液0.4mLを加えて静置した。これに水10mLを加えて15分静置した後、AN25mLを加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にAN10mLを加えて細砕した後、吸引ろ過した。これにNaCl10gと0.5mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)20mLを加え、10分間振とうした。その後、あらかじめAN10mLでコンディショニングしたAgilent Technologies製Bond Elut C18固相抽出カートリッジ(1g)を用いて、振とうによって得られたAN層とAN2mLを通液する処理を行った。得られた処理液を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/Tol(3:1)混液2mLに溶解した。Supelco製ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub>固相抽出カートリッジ(500mg/500mg)をAN/Tol(3:1)混液10mLでコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらにAN/Tol(3:1)混液20mLを注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液0.5mLに溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を、GC/MSによって測定した。測定条件は以下の通りである。装置:7890/5975c GC/MSシステム(Agilent Technologies製)、カラム:DB-5ms(30m×0.25mm、膜厚0.25μm、Agilent Technologies製)、カラム温度:50℃で2分間保持した後、+20℃/分で160℃まで昇温し、さらに+7℃/分で300℃まで昇温し、

10分間保持、注入口温度:250℃、検出器温度:230℃(イオン源)、注入方式:スプリットレス、キャリアガス:ヘリウム、注入量:1μL、イオン化条件:EI、定量に用いたm/z:314(クロルピリホス)、324(クロルピリホス-d<sub>10</sub>)、304(ダイアジノン)、314(ダイアジノン-d<sub>10</sub>)、277(フェニトロチオン)、283(フェニトロチオン-d<sub>6</sub>)、158(マラチオン)、164(マラチオン-d<sub>6</sub>)、188(アラクロール)。

分析法2(QuEChERS法)では、玄米試料1gに農薬混合溶液0.1mL(添加回収試験の場合のみ)および内標準溶液0.1mLを加えて静置した。水10mLを加えてさらに15分間静置し、AN10mLを加えて1分間振とう(手振り)した。これに4gのMgSO<sub>4</sub>、1gのNaClを加え、1分間振とう(手振り)した。この抽出液を3500rpmで5分間遠心分離し、上澄み液に固相剤を添加して1分間振とう(手振り)した。このとき固相剤として300mgのPSA、45mgのグラファイトカーボンブラック、300mgのC18、900mgのMgSO<sub>4</sub>を加えた。再び3500rpmで5分間遠心分離した後、上澄み液を窒素により乾固した。アラクロール溶液の0.2mLを添加して、GC/MS測定用の試料溶液とした。試料溶液中の対象農薬をGC/MSによって測定した。測定条件は、分析法1と同じである。ただし、夾雑物によってクロマトグラムのピークが妨害されるため、定量に用いたm/zのうち、マラチオンを285、マラチオン-d<sub>6</sub>を291とした。

分析で得られた結果を基に、以下の式によって農薬濃度を算出した。

$$C = F_e \times \frac{R_s}{R_c} \times \frac{M_c \times C_c \times P \times M_{sp(s)}}{M_s \times M_{sp(c)}} \quad (1)$$

ただし、 $C$ : 試料中の農薬濃度、 $F_e$ : 前処理の精度に関わる係数(=1)、 $R_s$ : 試料溶液測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 $R_c$ : 検量線溶液の測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 $M_c$ : 検量線溶液中の農薬混合液の質量、 $C_c$ : 農薬混合液中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 $P$ : 分析対象農薬の高純度標準品の純度、 $M_{sp(s)}$ : 試料に添加した内標準溶液の質量、 $M_s$ : 試料量、 $M_{sp(c)}$ : 検量線溶液中の内標準溶液の質量、である。

添加回収試験においては、式(1)に準じて算出した一斉試験法(分析法1)およびQuEChERS法(分析法2)の分析値を、玄米試料への添加濃度(クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン: 0.1 mg/kg, フェニトロチオン: 0.2 mg/kg)と比較することにより、正確さを評価した。残留農薬検査用玄米試料の分析においては、式(1)に準じて算出した一斉試験法(分析法1)およびQuEChERS法(分析法2)による分析値を、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

## C. D. 研究結果および考察

### 1 渡辺研究分担

#### 1.1 スプレードライヤを用いた残留農薬検査用試料の開発:

水 20%を添加した 80%アセトニトリル懸濁液に 4 種農薬(ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン、クロルピリホス)を添加し、昨年度作製した条件で行った。す

なわち、アトマイザの回転数: 20000rpm、処理量 2kg/h、噴霧温度(入口温度)を 120°C、100°C、80°Cで検討した。表 1~4 に各農薬の回収率の変化を示す。また、図 3 に噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率を示す。今回は水を加えたために、大きな粒子の玄米粉の沈降が少なかった。また、各噴霧温度においても 100%アセトニトリルを用いた時と比べて回収率は高くなり改善した。農薬の回収率は噴霧温度が下がるほど高くなった。これは、温度により農薬が分解または気散している可能性が示唆された。ダイアジノンは沸点が 120°Cで添加農薬の中で一番沸点が低く、回収率も一番低かった。噴霧温度が 120°Cのとき回収率は 8.9%となり、80°Cでは 26%と回収率は改善した。一方、他の 3 農薬の回収率の挙動は、沸点がいずれも 140°C以上であることからほぼ同じとなった。噴霧温度が 80°Cのとき回収率は 35%~40%程になり、最も回収率が良好であった。図 4 には自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真を示す。図 5~7 には噴霧温度を 120°Cから 80°Cまで変化させたときの粒度分布と顕微鏡写真を示す。噴霧温度が下がるにつれて平均粒子径が小さくなった。アセトニトリルが 80%であり、まだ有機溶媒濃度が高いことから、懸濁液中の玄米粉が凝集して沈降する傾向が高った。そこでホモミキサーを用いて凝集を抑えた。

次に、農薬の回収率をさらに高くするために水の比率を高くした。すなわち 40%アセトニトリルとした。これにより玄米粉中への農薬の浸透度が高くなると考えられる。表 5~8 に各農薬の回収率を、図 8 に噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率を示す。また、図 9 には自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写

真を図 10~12 には各温度で噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真を示す。80%アセトニトリルに比べいずれの農薬でも回収率は高くなった。回収率は噴霧温度が 80℃のときクロルピリホスは 60%以上と良好となった。マラチオンおよびフェニトロチオンも 50%以上となった。回収率は各農薬の沸点の高さの順となった。80%アセトニトリルに比べ噴霧温度による回収率の変化は小さかった。これは農薬の玄米粉中への浸透が増したためと考えられた。すなわち、噴霧温度による農薬の分解が少なくなったためと思われる。80%アセトニトリルのときと同様、噴霧温度が下がるにつれて平均粒子径が小さくなった。

以上より、作製溶媒の水の比率が大きくなると回収率も高くなり、また、噴霧温度を下げることで、さらに回収率が高くなることが分かった。さらに水の比率を高くすることは農薬の溶解性によるので、本条件が適正であると思われる。今後は本条件での再現性を確認する必要がある。

## 1.2 器具・容器包装の原材料の材質別規格に関する調査試料作製検討：

試料基材及び溶解溶媒の選定は、各ポリマー 0.1 g に各溶解溶媒 1 mL を加え、室温または 65℃の水浴中での溶解性を観察したところ、PET 樹脂については、フェノール系ハロゲン溶媒との混液を除き、使用したほとんどの溶解溶媒に溶解しなかった。また、溶解してもシート成形後の状態が不良または溶媒臭が残り、使用に不適切であった。ポリプロピレンペレット及びポリエチレンペレットは、いずれの溶媒にも溶解不可であった。ジクロロメタンあるいはクロロホルム

に溶解を確認できたポリスチレン、発泡スチロール、ABS、及び AS の各ペレットのうち、試料基材にポリスチレンペレットを、また溶解溶媒にジクロロメタンを選定した。作製条件①ポリマー溶液調製（ポリマー含量）では、ポリマー含量を約 5、10、15、20w/v%としたところ、溶解溶媒の揮発状態から、約 10w/v%を選択した。

作製条件②作製容器へのポリマー溶液分注量では、シート作製容器（ポリプロピレン製トレー）にポリマー溶液を 50、100、200、300、500 g ずつ分注し、自然乾燥による溶媒揮発後のシート成形の状態を観察した結果、100 g 及び 200 g の分注が良好であった。調査試料としての配付量を確保することを考慮し、200 g の分注（ポリマー質量 20 g）とした。

作製条件③作製したシート内の均質性評価では、大きさの異なる大、小の作製用トレーに分注し、シートを作製したところ、トレー大に分注して得られたシート 2 枚につき各々 3 分画し、各分画を各々細切均質化し、各 n=1 で測定を行った結果、各シートにおける 3 分画についてのばらつきはいずれも 5%以下であり、シート内のカドミウム及び鉛濃度はおおよそ均質であると考えられた。トレー小に分注して得られたシート 3 枚は、いずれもシートが厚い部分（約 1 mm）と薄い部分（約 0.5 mm）が生じていた。それらの厚い部分と薄い部分に切り分け、各々細切均質化し、各 n=1 で測定を行った結果、カドミウム及び鉛濃度はいずれも、シートが厚い部分の回収率が薄い部分と比較して低い結果であった。シートを自然乾燥して溶媒を揮発する際に、薄い部分と厚い部分では乾燥の程度に差があり、厚い部分には

溶解溶媒が残存しているため、実質採取した試料量が少なくなり、回収率の低下の要因となったと考えられた。

作製条件④溶解溶媒除去条件では、溶解溶媒の除去にドライヤー、ウィンディオープン、電子レンジ及びホットプレートを用いて加温乾燥したところ、いずれも質量には変化はなく、加温による処理は効果が認められなかった。そこで、常温における処理方法について検討した。真空乾燥器で5時間真空乾燥（常温）した結果、顕著な効果は認められなかったが、デシケーター（シリカゲル）内静置では残留溶媒（ジクロロメタン）量が減少し、デシケーター（シリカゲル）内放置の効果が確認できた。しかし、シート成形後デシケーター（シリカゲル）内で約1か月放置後の調査試料にシート質量の減少はほぼ見られず、溶解溶媒除去は限界に達したと考えられた。

作製条件⑤残留溶媒（ジクロロメタン）、カドミウム及び鉛含量では、作製したシートの厚い部位と薄い部位について、ジクロロメタン、カドミウム及び鉛含量を各部位に付き  $n=2$  で測定した。その結果、ジクロロメタン含量は、シートが厚い3部位について2.19~3.41%、また薄い2部位について1.29~2.45%であり、シートが厚い試験部位の方が薄い試験部位よりジクロロメタン含量が高い傾向であった。一方、カドミウム及び鉛含量については、いずれの厚さの試験部位においても理論作製濃度  $50 \mu\text{g/g}$  に対して、カドミウムが92~98%、鉛は88~98%の良好な回収率であったが、シートが薄い試験部位と比較して厚い試験部位の方が、ジクロロメタン含量が高く、一方でカドミウム及び鉛含量は低い傾向が明らかとなり、

シート中のジクロロメタン含量がカドミウム及び鉛含量（濃度）に影響を及ぼすことが示唆された。

ジクロロメタンが約1~3%残留する可能性は考えられたが、シートの厚みが均質となるよう作製し、1シート内のカドミウム及び鉛濃度を測定し、均質性の確認をした。1シートを20分画しそれぞれの分画について  $n=1$  でカドミウム及び鉛濃度を測定した。その結果、ポリマー質量当たり添加標準溶液測定濃度に対する回収率は94.1~102.7%であり、このときの相対標準偏差 ( $n=20$ ) は5%以下であったことから、シート内のいずれのカドミウム及び鉛濃度も均質であると考えられた。

今後は、残留溶媒含量をより低くする方法を検討する。更に複数ロット間のばらつきの検討の他、スプレードライヤを用いる別の作製方法による可能性も含めて検討を行う必要があると考えられた。

### 1.3 特定原材料検査（乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ：

今年度の参加機関31機関中、モリナガ（カゼイン）キット使用機関は30機関、日本ハムキット使用機関は31機関であった。使用機関が各1機関であったプリマハムキットとモリナガ（ $\beta$ LG）キットについては参加機関が少なかったため、解析を行わなかった。

解析の結果、MCにより除外された機関はなかった。zスコアの絶対値が3以上となる機関は各解析ごとに0~1機関認められた。Xbar管理図では管理限界線の範囲を超える機関はなく、R管理図で管理限界線を超える機関は各解析ごとに0~1機関認められた。

したがって、ほとんどの参加機関で精度の高い試験が行われていると考えられた。

#### 1.4 微生物調査試料添加菌濃度の低減に関する検討：

E.coli 検査、腸内細菌科菌群検査において、また大腸菌群検査の1菌種を除く5菌種において、①公定法の試験操作で陽性・陰性の判定が可能であること、②実際の食品検査に近いマトリクスの基材で冷蔵保存が可能であること、③冷蔵保存で微生物の添加から14日以上安定性が認められること（添加直後と添加14日後の差が対数値で±1.0ポイント以内）、④冷蔵から22.5℃（常温）に移管後も生菌数が測定可能であること（輸送時の温度上昇で急激に菌数が低下しない）、の4条件をクリアし、調査試料としての妥当性が認められた。

## 2 石井研究分担

### 微生物定性試験法における検出下限値の推定

食品衛生法で定められた冷凍食品のE.coli試験法のLOD<sub>50</sub>は14~27 cfu/gであった。この菌濃度はEC発酵管への接種菌量に換算すると0.42~0.81 cfuであり、EC発酵管中に1個以上の菌が存在すれば、検出可能であると推察され、定性試験の検出感度としては十分であると考えられた。

### 食品添加物試験法の妥当性に関する研究

TBHQ試験法では規定分析法が適用可能と考えられる食品はクッキー、ポテトチップ、いかくん及びチリソースであった。適用できないと考えられる食品はごま油及びピーナッツを含有する食品、煮干しであった。

サイクラミン酸試験法（精製操作あり）で

は、適用可能な食品はぶどうジュース、みかんシロップ漬けで、適用不能な食品はたくわん漬け、らっきょう漬け、米酢、ジャム、ビスケット、チョコレートであった。

サイクラミン酸試験法（スクリーニング試験法）では適用可能な食品はジャム、ぶどうジュース、米酢及びみかんシロップ漬けであった。適用不能な食品はたくわん漬け、ビスケット及びチョコレートであった。らっきょう漬けについては併行精度のみ性能基準を満足しなかった。

ソルビン酸試験法及び二酸化硫黄及び亜硫酸試験法のアルカリ滴定法では今回、検討した食品種すべてにおいて性能基準を満足する結果が得られ、適用可能な試料であると考えられた。

今後適用不能が食品種と試験法の組み合わせについて改良法を検討していく予定である。

## 3 村上研究分担

測定阻害についての評価では、産地や品種が異なるカカオとシナモンについて、これまでの報告と同様に小麦と落花生の測定への阻害が確認された。カカオについては重合度の異なる

Polyvinylpyrrolidone (PVP)を共存させて抽出を行った結果、重合度の低いPVP K15を添加することによって小麦と落花生で回収率が改善された。一方で、シナモンについてはPVPの添加のみでは十分な回収率が得られなかったが、Cold water fish skin由来のGelatinを利用することによって回収率の改善が確認された。今後は精度管理用試料の作成のために、適正資材と安定性について確認を

行う必要がある。最終的には、改良した検査法を複数機関による評価することにより、より信頼性の高い検査法の確立に繋がると考える。

#### 4 鎗田研究分担

##### 4.1 検査用試料の調製と評価

###### (1) 検査試料の調製の結果

ホタテガイ 100 匹分の可食部約 2.4 kg をブレンダーで細断し、試料約 2.3 kg を得た。さらにこの試料を裏ごしし、可食部に含まれる繊維質分を除去した。回収した試料量は約 1.8 kg であった。この試料をポリ製広口瓶に入れて約 1 時間 30 分回転混合した。均質化したホタテガイ可食部とホタテガイ中腸腺試料は、2 段階に分けて混合した。はじめに、ホタテガイ中腸腺試料 10 g を精秤し、その 9 倍量のホタテガイ可食部を加えて混合した。次に、得られた 9 つの混合物をさらに混合し、混合物約 770 g を得た。この混合物の均質性に関して外観上の問題はないと判断された。

そこで、回転混合させた試料をおおよそ 5 等分にした後、各ガラス瓶の内容物をポリ製遠沈管 5g ずつ小分けした。

以上によって、検査用試料 123 本を調製することができた。

###### (2) 検査用試料の分析の結果

本報告書では、検査用試料の分析結果は、調製値に対する相対値としてのみ記載している。これは、実測値を記した場合にはパイロットスタディにおいて参加機関の技能を正確に評価できなくなるためである。

(1) で調製した検査試料中の OA ホタテガイ中腸腺試料中の OA と DTX1 濃度を測定し、調製値と比較した。その結果、OA と DTX1 そ

れぞれの調製濃度を 1 としたときの測定結果は、1.6(OA) および 1.4(DTX1) であった。分析回数が少ないために (n=2) 断定まではできないが、分析値が何らかの誤差要因を含んでいることが考えられた。その候補として LC-MS/MS 測定におけるマトリックス効果が考えられたので、これを検証することにした。

##### 4.2 マトリックス効果の影響評価

###### (1) ホタテガイ可食部を用いた評価結果

M 試料、E 試料、C 試料の LC-MS/MS 測定を行ったところ、OA については、E 液および C 液の測定感度は M 液の測定感度よりも高かった。一方、DTX1 については、E 液および C 液の測定感度は M 液の測定感度よりも低く、4.1(2) の結果とは反対の傾向を示した。しかしながら、M 液の感度と、E 液および C 液の感度の違いに統計的な有意差は認められなかった。E 液と C 液の感度にも有意差は認められず、少なくとも測定感度に関してはヘキサン洗浄および固相抽出処理の明確な効果はみられなかった。ただし、いずれの測定結果においても、測定の再現精度は 10 %以上(相対値)あったため、LC-MS/MS と相補的に使用可能な正確測定法の開発が必要と考えられた。

###### (2) ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた評価結果

ホタテガイ中の下痢性貝毒検査では、可食部ではなく中腸腺を分析することにより、OA 群が基準値以下であるかを判定することも可能である。この方法は、OA 群が中腸腺に濃縮されることを利用したものである。分析操作においては、抽出および加水分解後の精製操作を省略し、希釈のみを行うことにより LC-MS/MS 測定が可能になる利点

がある。しかし、この分析方法においても LC-MS/MS 測定におけるマトリックス効果が測定結果に影響しうると考えられた。そこで、中腸腺から調製した試験所間比較試料をマトリックスとして、検証を行った。

各溶液の KC-MS/MS 測定の結果から、液中の OA および DTX1 とピーク面積との関係線を得た。関係線の傾きの差があれば、LC-MS/MS の感度が異なることを示唆している。本測定条件においては、中腸腺マトリックスによって LC-MS/MS の感度（すなわちイオン化の効率）が高くなるエンハンスメントが確認された。また、固相抽出処理をした場合、および、希釈倍率が高いほど、マトリックス効果の影響は小さくなった。しかし、いずれの関係線の傾きについても、試験所間比較試料由来のマトリックスを含まない M1 液の関係線の傾きとは、有意な違いがみられた。

以上より、中腸腺試料中の OA と DTX1 を正確に測定するためには、マトリックス効果の影響を除外する必要があることが確認できた。

## 5 大竹研究分担

添加回収試験において、分析法 1 で得られた定量値と調製値の比を比較した結果、クロルピリホスが 102 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 97 %、マラチオンが 103 % となり、本方法によって調製値通りの分析値が得られることが示された。また各農薬の標識体の回収率も、80~86 % と良好であった。なお、マトリックスマッチングを行っていない検量線溶液を用いた場合の算出結果は、クロルピリホスが 104 %、ダイアジノンが 99 %、フェニトロチオンが

89 %、マラチオンが 98 % であり、マトリックスマッチ検量線溶液との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。よって、マトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であると考えられた。

同様に、分析法 2 の QuEChERS 法で得られた定量値と調製値の比は、クロルピリホスが 99 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 99 %、マラチオンが 101 % となり、QuEChERS 法によっても調製値通りの分析値が得られることが示された。さらに、各農薬の標識体の回収率も、71~77 % と良好であった。これより、本研究で対象とした玄米中の農薬に対して、簡易分析法にもかかわらず、QuEChERS 法によって十分に対象農薬が抽出され、正確な分析値が得られることが示された。なお一斉試験法と同様に、マトリックスマッチングしていない検量線を用いた場合の比も算出した。簡易法である QuEChERS 法は一斉試験法よりも精製効果が低いと考えられたため、IDMS においてもマトリックス効果の影響をより強く受ける可能性があるため、本検討はより重要となる。計算の結果、クロルピリホスが 103 %、ダイアジノンが 98 %、フェニトロチオンが 87 %、マラチオンが 103 % であり、マトリックスマッチ検量線溶液との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。結果的には一斉試験法と大きな差は見られず、QuEChERS 法においてもマトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であるという結果が得られた。

食品薬品安全センター秦野研究所より提供された残留農薬検査用玄米試料の、Lot 1 (120 °C)、2 (100 °C)、3 (80 °C) (温度

は噴霧温度を示す) の 3 種類に含まれる対象農薬を、一斉試験法および QuEChERS 法によって分析した。得られた結果より、クロマトグラムにおいて対象農薬のピークに夾雑物による妨害が見られず、一斉試験法と QuEChERS 法の定量結果もよく一致していた。食品薬品安全センター秦野研究所によると、添加濃度はクロルピリホス: 0.1, ダイアジノン: 0.4, フェニトロチオン: 0.2, マラチオン: 0.2 (単位は mg/kg) であり、調製時の回収率は 20~60 %程度と予想されるということであった (農薬の種類によって回収率は異なる)。本研究で得られた結果を用いて、調製時の回収率を計算した結果、30.1 %~63.3 %となった。これより、一斉試験法および QuEChERS 法の分析結果が、添加濃度と調製時の回収率から予測される濃度の範囲とよく一致していたことが示された。以上より、玄米中の対象農薬について、本研究で検討した方法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 竹林 純, 高坂典子, 鈴木一平, 中阪聡亮, 平林尚之, 石見桂子, 梅垣敬三, 千葉 剛, 渡辺卓穂: 食品中の栄養成分検査の技能試験 (2017-2018), 食品衛生学雑誌, 61, 63-71 (2020)

### 2. 学会発表

1) 池田真希, 久保田佳子, 八木真美, 佐藤夏岐, 西垣嘉人, 平林尚之, 高坂典子, 渡辺卓穂: 玄米試料を用いた重金属試験プログラムのパイロットスタディ, 日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会 (web

開催) (東京) 2020

2) 若栗忍, 佐藤夏岐, 渡辺卓穂: アレルギー物質 (小麦タンパク質) を含む特定原材料検査のための技能試験プログラムのパイロットスタディ, 日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会 (web 開催) (東京) 2020

## F. 知的所有権の取得状況

なし

令和2年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究

—スプレードライヤを用いた残留農薬用試料の開発(1)—

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	部長
研究協力者	高坂 典子	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	室長補佐
	平林 尚之	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	八木 真美	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	久保田佳子	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	池田 真季	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	研究員

**研究要旨**

前年度、玄米粉中の残留農薬については、100%アセトニトリルにダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン及びクロルピリホスを溶解させ、玄米粉を加え懸濁攪拌させ、スプレードライヤの噴霧温度（入口温度）を120℃、100℃、80℃で比較検討した結果、回収率は5%～25%と非常に低かったことから、回収率を改善するために、水を加え、80%アセトニトリル溶液に各農薬を添加し、作製検討した。100%アセトニトリルに比べ、回収率は格段に改善した。噴霧温度が下がるほど各農薬の回収率は高くなった。また、回収率は農薬の沸点にも依存していた。つぎに、水の比率を増やし、40%アセトニトリル溶液を用いて検討した。80%アセトニトリルに比べいずれの農薬でも回収率は高くなった。回収率は噴霧温度が80℃のときクロルピリホスは60%以上と良好となった。マラチオンおよびフェニトロチオンも50%以上となった。回収率は各農薬の沸点の高さの順となった。

**A. 研究目的**

これまで技能試験プログラム用試料は実試料に近い湿試料を開発し作成していた。湿試料の場合、長時間にわたる安定性を維持することは非常に困難であった。野菜ペースト中の残留農薬や豚肉ペースト中の残留動物用医薬品などはその

基材由来の成分や酵素などにより分解を受け易く、安定性を担保することが課題である。これら技能試験プログラム用試料は、安定性ばかりではなく、均質性も求められ、両者を満たされなければ試料として用いることができない。一方、湿試料に比べ乾試料は安定性が良いことは

知られており、安定性を期待する試料として紛体の乾試料を用いて技能試験も行われている。そこで、紛体の技能試験プログラム用試料の開発を目的とした。

乾燥した紛体の作製には、試料の分解を考慮すると凍結乾燥法が有力であるが、多量の試料を作製するためには向かない。また、紛体と紛体を混合しても、粒子径が同じでなければ均質なものはできない。そこで、液体原料を熱風中に噴霧して液滴の比表面積を増加させ短時間で水分を蒸発させる乾燥法であるスプレードライヤ（噴霧乾燥法）をこの技能試験プログラム用試料作製に応用できないか検討した。スプレードライヤは 20 世紀初めに脱脂粉乳の乾燥に用いられ発達した技術であり、種々の食品に応用されている。通常は液体原料に適用された技術であるが、我々は、玄米粉を用い、カドミウム溶液に懸濁させて作製条件の検討を行い、技能試験用試料として用いることができることを示した。今年度は、同一の玄米粉を用い、残留農薬用試料作製に応用し、基礎的検討を行った。

## B. 方法

### 1. 試料基材および試薬

試料基材として自家製玄米粉（宮城ひとめぼれを粉砕した）を用いた。農薬（ダイアジノン標準品、フェニトロチオン標準品、マラチオン標準品、クロルピリホス標準品）はいずれも Dr.Ehrenstorfer 製を用いた。また、溶解、抽出にアセトニトリル（HPLC 用、富士フィルム和光純薬）、トルエン（富士フィルム和光純薬）、ヘキサン（残留農薬用、富士フィルム

和光純薬）、アセトン（残留農薬用、富士フィルム和光純薬）および水（HPLC 用、富士フィルム和光純薬）を用いた。

### 2. 使用機器および測定条件

残留農薬標準品の秤量にはザルトリウス社製電子天秤（MSA225S100DI）を用いた。農薬の測定には島津製作所社製 GC/MS-QP2010 を使用した。カラムは DB-5MS（Agilent J&W）を用い、以下の測定条件で行った。

GC/MS 測定条件

カラムオープン温度: 50°C

気化室温度: 250°C

注入モード: スプリットレス

サンプリング時間: 1.5 分

線速度: 47.2 cm/秒

スプリット比: 15:1

温度プログラム: 50°C (1 分) ⇒ 125°C (25°C/分) ⇒ 300°C (10°C/分) 10 分

### 3. 標準溶液の調製

農薬の標準原液は、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンおよびクロルピリホスについて、それぞれの農薬標準原液を調製した。すなわち、各標準品を当該成績書の純度に基づき換算し、100.0 mg となるよう精密に量りとり、これにアセトンを加えて溶かし、正確に 100 mL として各農薬の標準原液（1000 µg/mL）とした。

### 4. 試料溶液の調製

GC/MS 用試料

試料 10.0 g に水 20 mL 加え、15 分間放置し、アセトニトリル 40 mL 添加し、3 分間ホモジナイズした。ホモジナイザー（GLH-115）のシャフトを少量のアセトニトリルで洗い、ホモジナイズした試

料と合わせ、ホモジナイズした試料を吸引ろ過した（受器：100 mL 容メスフラスコ、桐山ロート、No. 5A ろ紙）。残渣をろ紙ごと回収（スパーテル、ピンセット等を用いて抽出容器に戻した）し、アセトニトリル 20 mL を添加、攪拌後、再度 3 分間ホモジナイズした。シャフトを少量のアセトニトリルで洗い、ホモジナイズした試料と合わせ、吸引ろ過し、抽出容器内及び残渣をアセトニトリルで洗い込み、ろ液を全て合わせ、アセトニトリルで正確に 100 mL とした。分液ロートに抽出液 20 mL を正確にとり、振とう機で 10 分間振とうした。30 分以上静置した後、分離した下層（水）を除去し、予め C18 ミニカラムをアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした。このカラムを吸引マニホールドにセットし、分離したアセトニトリル層を注入した。さらに、アセトニトリル 2 mL を注入し、全溶出液を回収した。脱水後（15 分間放置、この間 3 回程度振り混ぜた）、無水硫酸ナトリウムを綿栓ろ過によりろ別した（受器：100 mL 容ナス型フラスコ）。得られたろ液を 40° C 以下（設定 35° C）で濃縮乾固した。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 2 mL に溶解後、超音波処理した。精製には、予め GC/NH<sub>2</sub> ミニカラムをアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 10 mL でコンディショニングした。抽出液全量（約 2 mL）を GC/NH<sub>2</sub> カラムに負荷し（受器：50 mL 容ナス型フラスコ）、ナス型フラスコ内をアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 10 mL で洗い、この液を GC/NH<sub>2</sub> カラムに負荷することを

2 回繰り返した（10 mL×2 回）。次に溶出液を 40° C 以下（35° C 設定）で 1 mL 以下に濃縮し、これにアセトン 10 mL を加えて 40° C 以下（35° C 設定）で 1 mL 以下に濃縮、再度アセトン 5 mL を加えて濃縮した溶媒を除去した。残留物に A/H 混液 2 mL を正確に加えて溶解後、超音波処理して試験溶液及び空試験溶液とし（試料基材 1 g/mL 相当）し、試料溶液及び空試料溶液は共栓試験管（10 mL 容）に移し、測定日まで冷蔵庫で保管した。

## 5. 試料の作製

残留農薬用試料は自家製玄米粉を用い、玄米粉 1 kg をアセトニトリルまたはアセトニトリル/水 4 L に懸濁させ、スプレードライヤに供した。

### 5. スプレードライヤによる玄米粉試料作製条件

作製検討に用いたスプレードライヤは大川原化工機株式会社製研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤ CL-8i を用いた。玄米粉懸濁溶液は事前に攪拌し、均一な懸濁溶液とし、原液タンクに移し、攪拌しながらペリスタポンプでアトマイザに 2 kg/h で送液した。アトマイザにはロータリー式を用い、ディスクは MC-50 型を使用した。回転数は 20000 rpm に設定した。また、入り口温度は 120°C、100°C、80°C で作製温度を検討した。得られた玄米粉はマイクロトラックベル社製マイクロトラック MT3200 を用い平均粒子径を測定した。また、得られた玄米粉はガスクロマトグラフ質量分析計で 4 種の農薬を測定した。また、作製

した玄米粉は顕微鏡下で粒子の観察を行った。

(倫理面への配慮)

食品の安全に関する研究であり、倫理面への配慮をする必要はなかった。

## C. D. 研究結果および考察

### 1. スプレードライヤによる玄米粉試料作製検討

技能試験用試料として残留農薬検について検討した。残留農薬は水溶性のものは少なく、有機溶媒を用いた作製の検討となった。これまで用いたスプレードライヤはいずれも水溶液用であり、有機溶媒を用いる場合は、窒素ガス密閉循環型スプレードライヤがその作製には有効の装置である。本装置 CL-8i は予備検討に使用した L-8i の密閉系の装置であり、難水溶性物質の乾燥、造粒が可能であり、窒素循環させていることから酸化防止にもなり、残留農薬検査用試料作製には適した装置であると考えられた。基材としては重金属と同様の自家製玄米粉を用い、4種の農薬を図1に示すように試料作製した。図2には用いたスプレードライヤ CL-8i の外観を示す。本装置を使用することで、溶媒も回収でき、溶媒の沸点が低いので入口温度は低く設定できる。農薬は沸点の低いものもあり、どこまで回収できるかは不明である。そこで、アトマイザの回転数は 20000rpm とし、重金属の条件を参考にして処理量は 2kg/h に設定し、入口温度を 120℃、100℃、80℃の3条件で検討を行った。今回用いた溶媒はアセトニトリルであ

り、玄米粉と懸濁させたとき玄米粉の沈降速度が速くペリスタポンプで上方へ送液中に玄米粉粒子が沈降するスピードが速く、微細な粒子が先に導入されて、大きな粒子が遅れて導入されることがわかった。また、吸い込み口を下げると、大きな粒子も導入されるため、回収量が多くなることも確認された。よって、攪拌や導入口の位置など検討する必要があることがわかった。重金属の作製においては水を溶媒として用いたのに対して、農薬は有機溶媒を使用していることから玄米粉への溶媒の浸透度の違いがあり、農薬は玄米粉中への浸透は少なく、回収率が低くなったと考えられた。そこで、今年度は水を添加することで回収率が改善するか検討した。

最初に、水 20%を添加した 80%アセトニトリル懸濁液に 4 種農薬（ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン、クロルピリホス）を添加し、昨年度作製した条件で行った。すなわち、アトマイザの回転数：20000rpm、処理量 2kg/h、噴霧温度（入口温度）を 120℃、100℃、80℃で検討した。表 1~4 に各農薬の回収率の変化を示す。また、図 3 に噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率を示す。今回は水を加えたために、大きな粒子の玄米粉の沈降が少なかった。また、各噴霧温度においても 100%アセトニトリルを用いた時と比べて回収率は高くなり改善した。農薬の回収率は噴霧温度が下がるほど高くなった。これは、温度により農薬が分解または気散している可能性が示唆された。ダイアジノンは沸点が 120℃で添加農薬の中で一番沸点が低

く、回収率も一番低かった。噴霧温度が120℃のとき回収率は8.9%となり、80℃では26%と回収率は改善した。一方、他の3農薬の回収率の挙動は、沸点がいずれも140℃以上であることからほぼ同じとなった。噴霧温度が80℃のとき回収率は35%~40%程になり、最も回収率が良好であった。図4には自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真を示す。図5~7には噴霧温度を120℃から80℃まで変化させたときの粒度分布と顕微鏡写真を示す。噴霧温度が下がるにつれて平均粒子径が小さくなった。アセトニトリルが80%であり、まだ有機溶媒濃度が高いことから、懸濁液中の玄米粉が凝集して沈降する傾向が高った。そこでホモキサーを用いて凝集を抑えた。

次に、農薬の回収率をさらに高くするために水の比率を高くした。すなわち40%アセトニトリルとした。これにより玄米粉中への農薬の浸透度が高くなると考えられる。表5~8に各農薬の回収率を、図8に噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率を示す。また、図9には自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真を図10~12には各温度で噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真を示す。80%アセトニトリルに比べいずれの農薬でも回収率は高くなった。回収率は噴霧温度が80℃のときクロルピリホスは60%以上と良好となった。マラチオンおよびフェニトロチオンも50%以上となった。回収率は各農薬の沸点の高さの順となった。80%アセトニトリルに比べ噴霧温度による回収率の変化は小さかった。これは農薬の玄米粉中への浸透が増したためと考えられ

た。すなわち、噴霧温度による農薬の分解が少なくなったためと思われる。80%アセトニトリルのときと同様、噴霧温度が下がるにつれて平均粒子径が小さくなった。

以上より、作製溶媒の水の比率が大きくなると回収率も高くなり、また、噴霧温度を下げることで、さらに回収率が高くなることが分かった。さらに水の比率を高くすることは農薬の溶解性によるので、本条件が適正であると思われる。今後は本条件での再現性を確認する必要がある。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 竹林 純, 高坂典子, 鈴木一平, 中阪聡亮, 平林尚之, 石見桂子, 梅垣敬三, 千葉 剛, 渡辺卓穂: 食品中の栄養成分検査の技能試験 (2017-2018), 食品衛生学雑誌, 61, 63-71 (2020)

### 2. 学会発表

1) 池田真希, 久保田佳子, 八木真美, 佐藤夏岐, 西垣嘉人, 平林尚之, 高坂典子, 渡辺卓穂: 玄米試料を用いた重金属試験プログラムのパイロットスタディ, 日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会 (web開催) (東京) 2020

2) 若栗忍, 佐藤夏岐, 渡辺卓穂: アレルギー物質 (小麦タンパク質) を含む特定原材料検査のための技能試験プログラムのパイロットスタディ, 日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会 (web開催) (東京) 2020

表1 噴霧温度によるダイアジノンの回収率の変化 (80%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g) <sup>*1</sup>	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	20.11374	10.021	100	20	2	2	0.040143179	0.0401
	1-2	17.89556	10.033	100	20	2	2	0.035673398	0.0357
	1-3	15.42506	10.014	100	20	2	2	0.03080699	0.0308
	SD (μg/g)								0.0046522
									0.00465
	RSD (%)								13.098592
									13.1
2 (100°C)	2-1	33.38089	10.002	100	20	2	2	0.06674843	0.0667
	2-2	32.25566	10.005	100	20	2	2	0.06447908	0.0645
	2-3	35.19501	10.012	100	20	2	2	0.070305653	0.0703
	SD (μg/g)								0.002928
									0.00293
	RSD (%)								4.360119
									4.4
3 (80°C)	3-1	53.56182	10.012	100	20	2	2	0.106995246	0.107
	3-2	49.24045	10.002	100	20	2	2	0.098461208	0.0985
	3-3	52.77093	10.036	100	20	2	2	0.105163272	0.105
	SD (μg/g)								0.0044441
									0.00444
	RSD (%)								4.2692308
									4.3

表2 噴霧温度によるフェニトロチオンの回収率の変化 (80%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 ( $g^{*1}$ )	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ ( $\mu\text{g/g}$ )	
1 (120°C)	1-1	17.84996	10.021	100	20	2	2	0.035625107	0.0356
	1-2	15.97670	10.033	100	20	2	2	0.031848301	0.0318
	1-3	14.71462	10.014	100	20	2	2	0.029388097	0.0294
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0031262
									0.00313
	RSD (%)								9.6904025
									9.7
2 (100°C)	2-1	29.63505	10.002	100	20	2	2	0.059258248	0.0593
	2-2	27.71468	10.005	100	20	2	2	0.055401659	0.0554
	2-3	30.11551	10.012	100	20	2	2	0.060158829	0.0602
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0025515
									0.00255
	RSD (%)								4.373928
									4.4
3 (80°C)	3-1	41.06729	10.012	100	20	2	2	0.082036137	0.0820
	3-2	39.84995	10.002	100	20	2	2	0.079683963	0.0797
	3-3	40.40916	10.036	100	20	2	2	0.080528418	0.0805
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0011676
									0.00117
	RSD (%)								1.4498141
									1.4

表3 噴霧温度によるマラチオンの回収率の変化 (80%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 ( $g$ ) <sup>*1</sup>	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ ( $\mu\text{g/g}$ )	
1 (120°C)	1-1	18.96328	10.021	100	20	2	2	0.037847081	0.0378
	1-2	16.62438	10.033	100	20	2	2	0.0331394	0.0331
	1-3	15.85099	10.014	100	20	2	2	0.031657659	0.0317
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0031953
									0.00320
	RSD (%)								9.3567251
									9.4
2 (100°C)	2-1	31.69252	10.002	100	20	2	2	0.063372366	0.0634
	2-2	29.66383	10.005	100	20	2	2	0.059298011	0.0593
	2-3	32.37027	10.012	100	20	2	2	0.064662944	0.0647
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0028184
									0.00282
	RSD (%)								4.512
									4.5
3 (80°C)	3-1	42.00477	10.012	100	20	2	2	0.083908849	0.0839
	3-2	41.15865	10.002	100	20	2	2	0.08230084	0.0823
	3-3	41.20257	10.036	100	20	2	2	0.082109546	0.0821
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0009866
									0.000987
	RSD (%)								1.192029
									1.2

表4 噴霧温度によるクロルピリホスの回収率の変化 (80%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号 (Lot No.)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 ( $g$ ) <sup>*1</sup>	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ ( $\mu\text{g/g}$ )	
1 (120°C)	1-1	7.94248	10.021	100	20	2	2	0.015851671	0.0159
	1-2	6.92563	10.033	100	20	2	2	0.013805701	0.0138
	1-3	6.72056	10.014	100	20	2	2	0.013422329	0.0134
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0013429 0.00134
	RSD (%)								9.3055556 9.3
2 (100°C)	2-1	13.38017	10.002	100	20	2	2	0.026754989	0.0268
	2-2	12.15070	10.005	100	20	2	2	0.024289255	0.0243
	2-3	13.52056	10.012	100	20	2	2	0.02700871	0.0270
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0015044 0.00150
	RSD (%)								5.7692308 5.8
3 (80°C)	3-1	17.59603	10.012	100	20	2	2	0.03514988	0.0351
	3-2	17.29695	10.002	100	20	2	2	0.034586983	0.0346
	3-3	17.66105	10.036	100	20	2	2	0.035195397	0.0352
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0003215 0.000321
	RSD (%)								0.9171429 0.9

表5 噴霧温度によるダイアジノンの回収率の変化 (40%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 ( $g^{*1}$ )	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ ( $\mu\text{g/g}$ )	
1 (120°C)	1-1	59.94977	10.044	100	20	2	2	0.119374293	0.119
	1-2	54.40785	10.034	100	20	2	2	0.10844698	0.108
	1-3	55.66380	10.034	100	20	2	2	0.110950369	0.111
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0056862
									0.00569
	RSD (%)								5.0353982
									5.0
2 (100°C)	2-1	62.17425	10.023	100	20	2	2	0.124063155	0.124
	2-2	63.96700	10.004	100	20	2	2	0.127882847	0.128
	2-3	57.77365	10.020	100	20	2	2	0.115316667	0.115
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0066583
									0.00666
	RSD (%)								5.4590164
									5.5
3 (80°C)	3-1	82.14760	10.040	100	20	2	2	0.163640637	0.164
	3-2	85.73503	10.013	100	20	2	2	0.171247438	0.171
	3-3	73.12518	10.021	100	20	2	2	0.145943878	0.146
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.012897
									0.0129
	RSD (%)								8.0625
									8.1

表6 噴霧温度によるフェニトロチオンの回収率の変化 (40%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g) <sup>*1</sup>	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	47.39707	10.044	100	20	2	2	0.094378873	0.0944
	1-2	43.41596	10.034	100	20	2	2	0.086537692	0.0865
	1-3	44.80001	10.034	100	20	2	2	0.089296412	0.0893
	SD (μg/g)								0.0040054
									0.00401
	RSD (%)								4.4506104
									4.5
2 (100°C)	2-1	44.17473	10.023	100	20	2	2	0.088146723	0.0881
	2-2	45.60503	10.004	100	20	2	2	0.091173591	0.0912
	2-3	41.33300	10.020	100	20	2	2	0.082500998	0.0825
	SD (μg/g)								0.0044095
									0.00441
	RSD (%)								5.0515464
									5.1
3 (80°C)	3-1	53.17614	10.040	100	20	2	2	0.105928566	0.106
	3-2	55.10999	10.013	100	20	2	2	0.11007688	0.110
	3-3	52.94890	10.021	100	20	2	2	0.105675881	0.106
	SD (μg/g)								0.0023094
									0.00231
	RSD (%)								2.1588785
									2.2

表7 噴霧温度によるマラチオンの回収率の変化 (40%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g) <sup>*1</sup>	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	44.86233	10.044	100	20	2	2	0.089331601	0.0893
	1-2	41.76039	10.034	100	20	2	2	0.083237772	0.0832
	1-3	42.84426	10.034	100	20	2	2	0.085398166	0.0854
	SD (μg/g)								0.0030892
									0.00309
	RSD (%)								3.5930233
									3.6
2 (100°C)	2-1	40.56989	10.023	100	20	2	2	0.080953587	0.0810
	2-2	42.83499	10.004	100	20	2	2	0.085635726	0.0856
	2-3	37.92357	10.020	100	20	2	2	0.075695749	0.0757
	SD (μg/g)								0.0049541
									0.00495
	RSD (%)								6.1262376
									6.1
3 (80°C)	3-1	51.11512	10.040	100	20	2	2	0.101822948	0.102
	3-2	51.71420	10.013	100	20	2	2	0.103294118	0.103
	3-3	52.01384	10.021	100	20	2	2	0.10380968	0.104
	SD (μg/g)								0.001
									0.00100
	RSD (%)								0.9708738
									1.0

表8 噴霧温度によるクロルピリホスの回収率の変化 (40%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号 (Lot No.)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 ( $g^{*1}$ )	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ ( $\mu\text{g/g}$ )	
1 (120°C)	1-1	27.16440	10.044	100	20	2	2	0.0540908	0.0541
	1-2	27.08007	10.034	100	20	2	2	0.053976619	0.0540
	1-3	26.43986	10.034	100	20	2	2	0.052700538	0.0527
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.000781
									0.000781
	RSD (%)								1.4570896
									1.5
2 (100°C)	2-1	28.06268	10.023	100	20	2	2	0.055996568	0.0560
	2-2	28.87181	10.004	100	20	2	2	0.057720532	0.0577
	2-3	25.81674	10.020	100	20	2	2	0.051530419	0.0515
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0032036
									0.00320
	RSD (%)								5.8076225
									5.8
3 (80°C)	3-1	31.71639	10.040	100	20	2	2	0.06318006	0.0632
	3-2	31.69426	10.013	100	20	2	2	0.063306222	0.0633
	3-3	30.62227	10.021	100	20	2	2	0.061116196	0.0611
	SD ( $\mu\text{g/g}$ )								0.0012423
									0.00124
	RSD (%)								1.984
									2.0

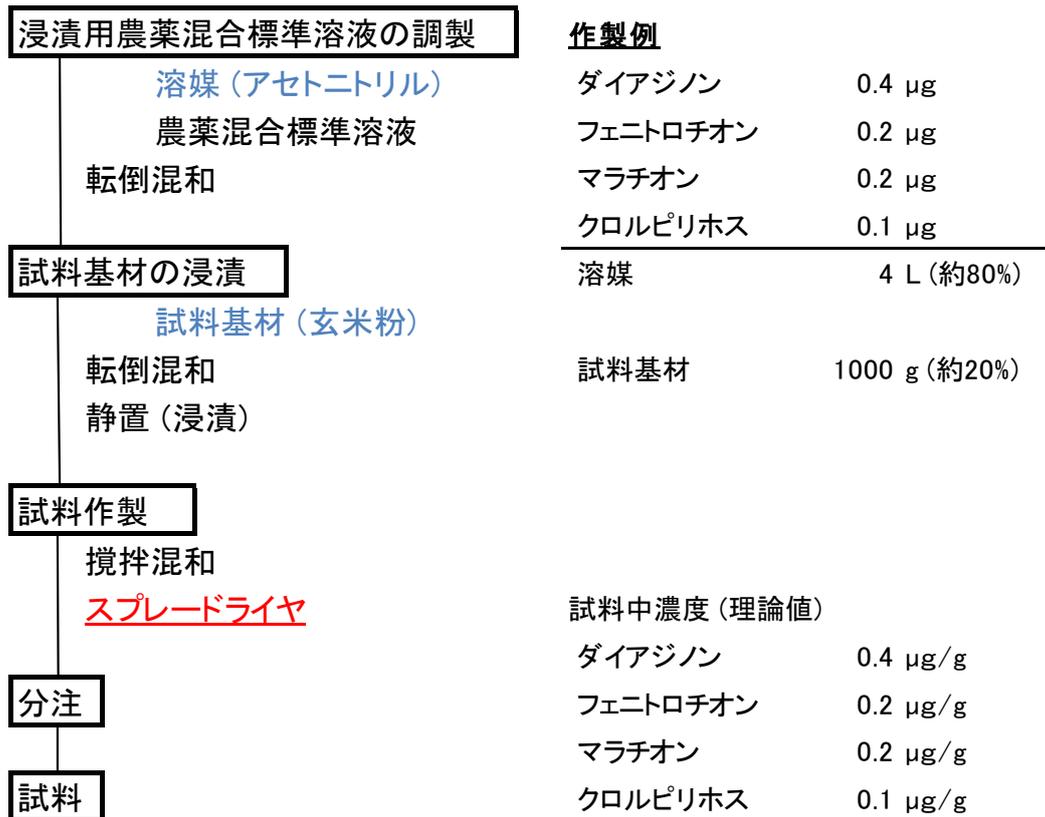


図1 スプレードライヤによる技能試験用残留農薬検査試料作製スキーム



図2 窒素ガス密閉循環型スプレードライヤCL-8iの外観

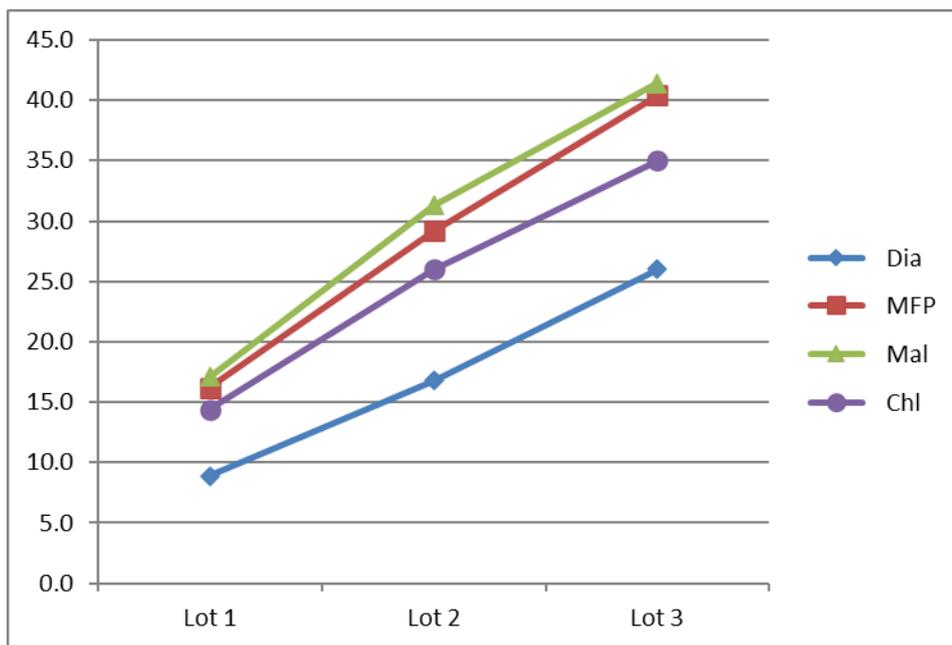


図3 噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率の比較 (80%アセトニトリル)

Lot1:120°C、Lot2:100°C、Lot3:80°C

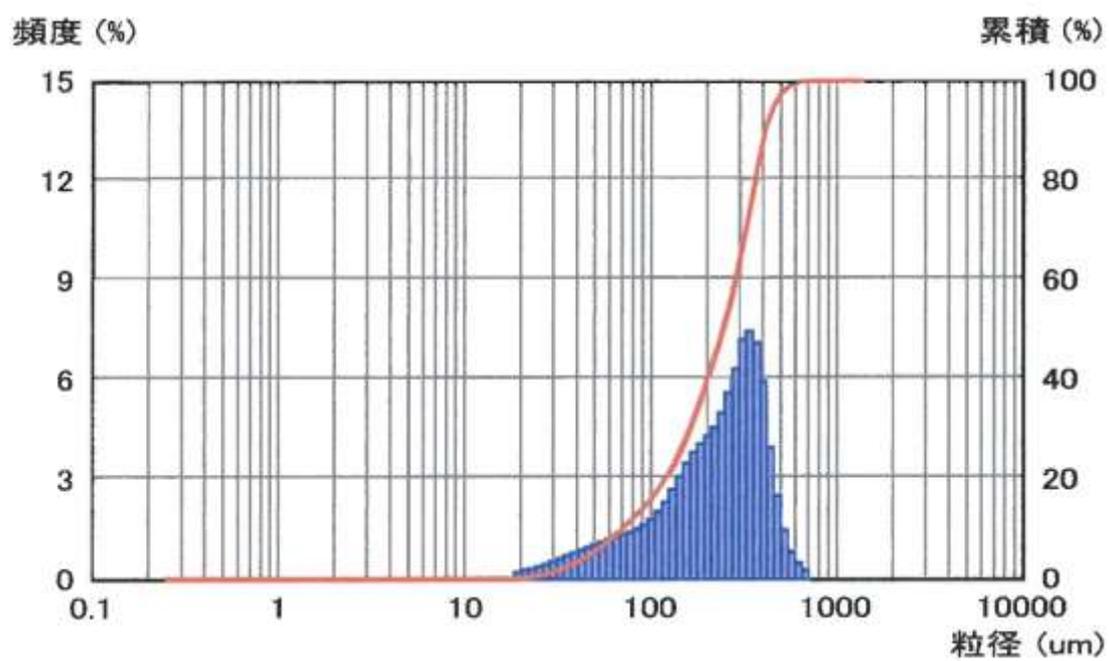
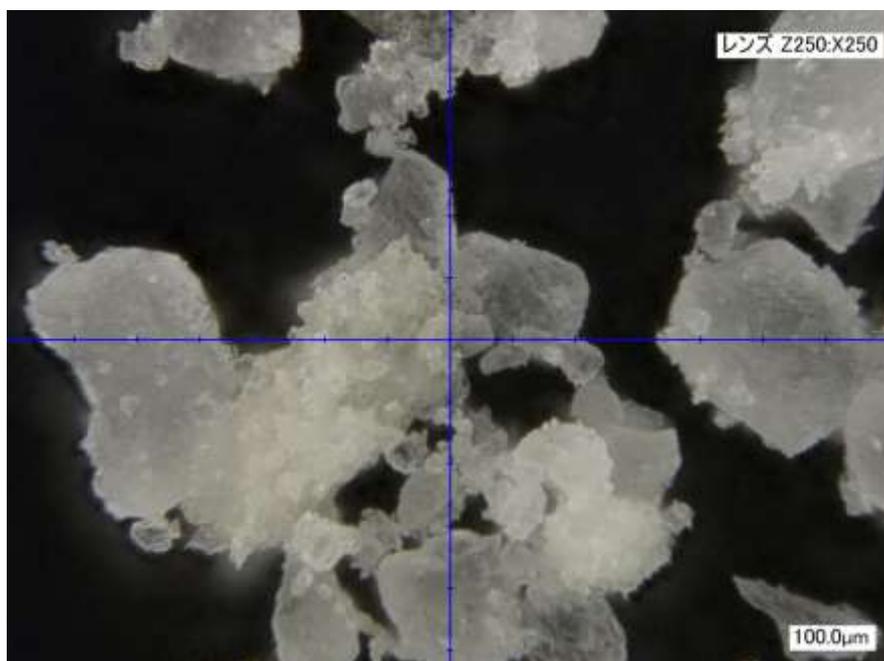


図4 自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真

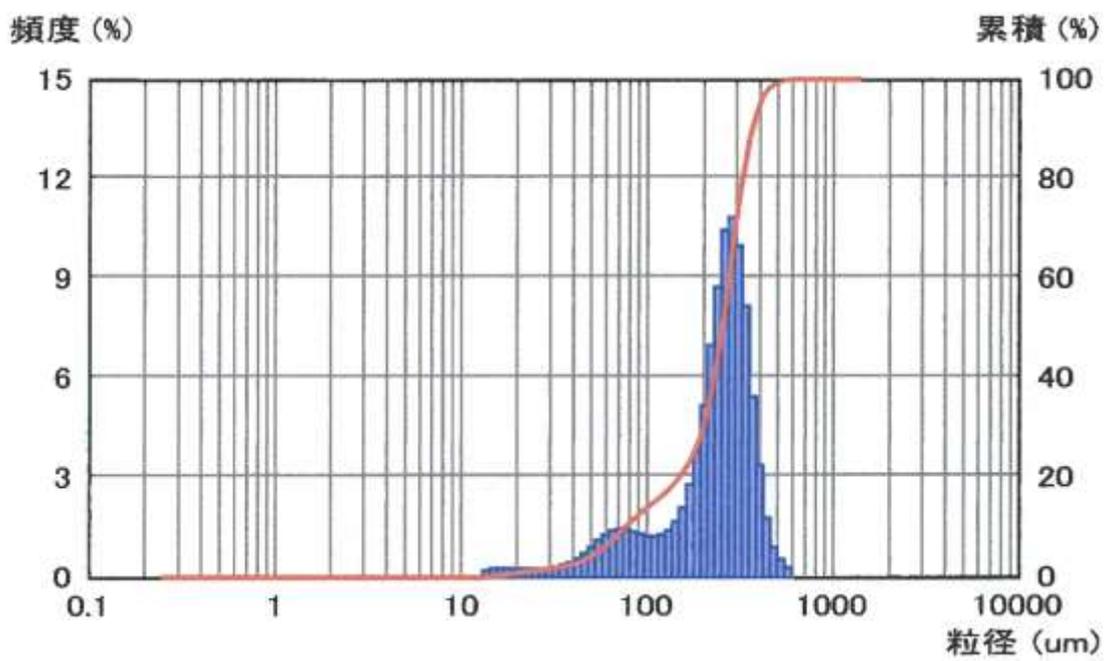
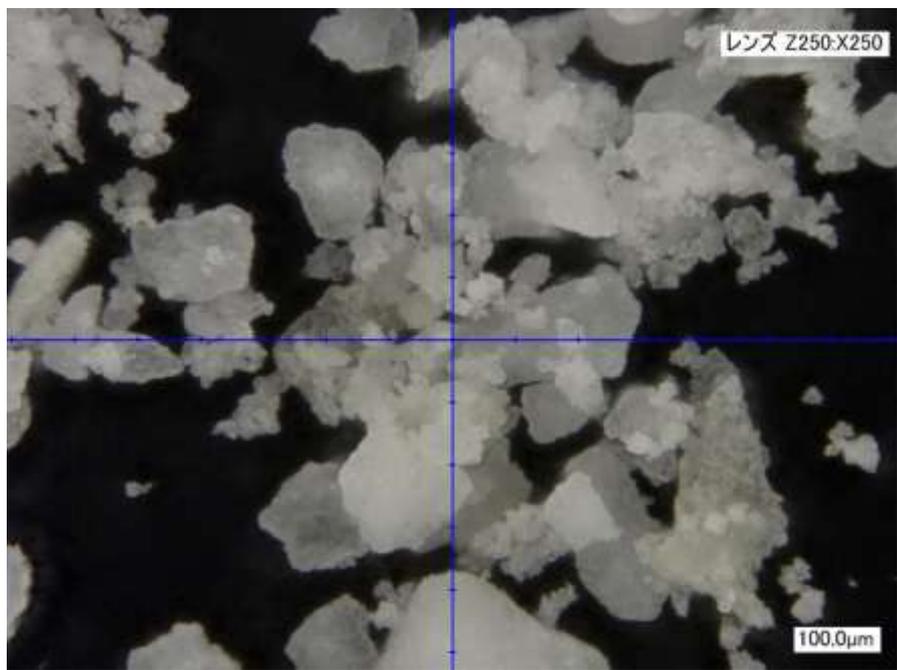


図5 120°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真

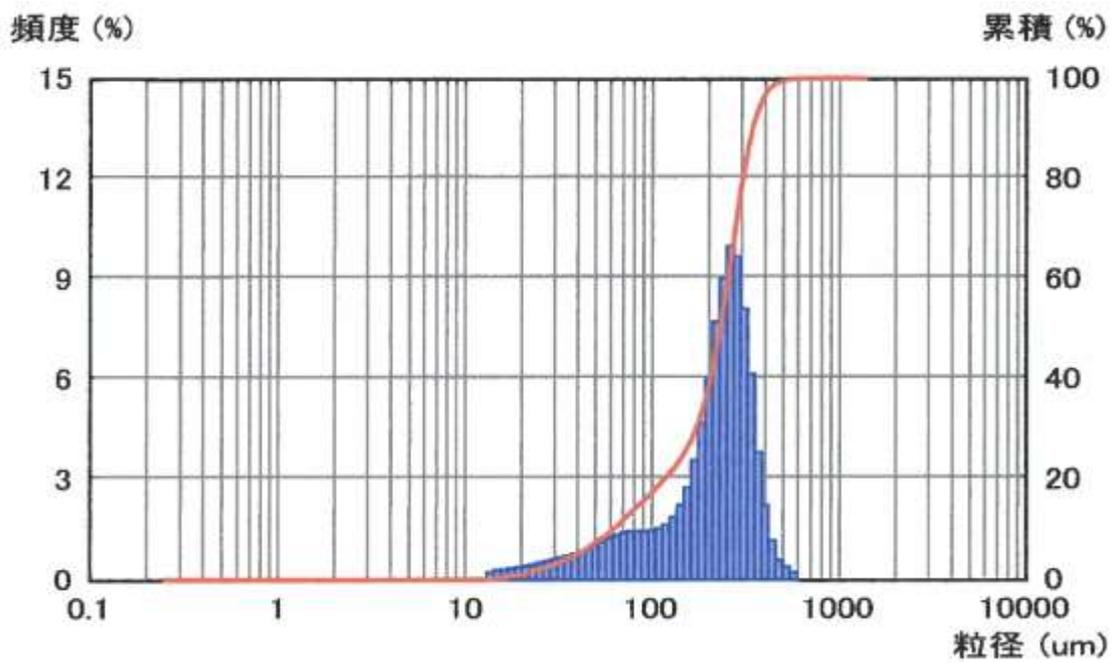
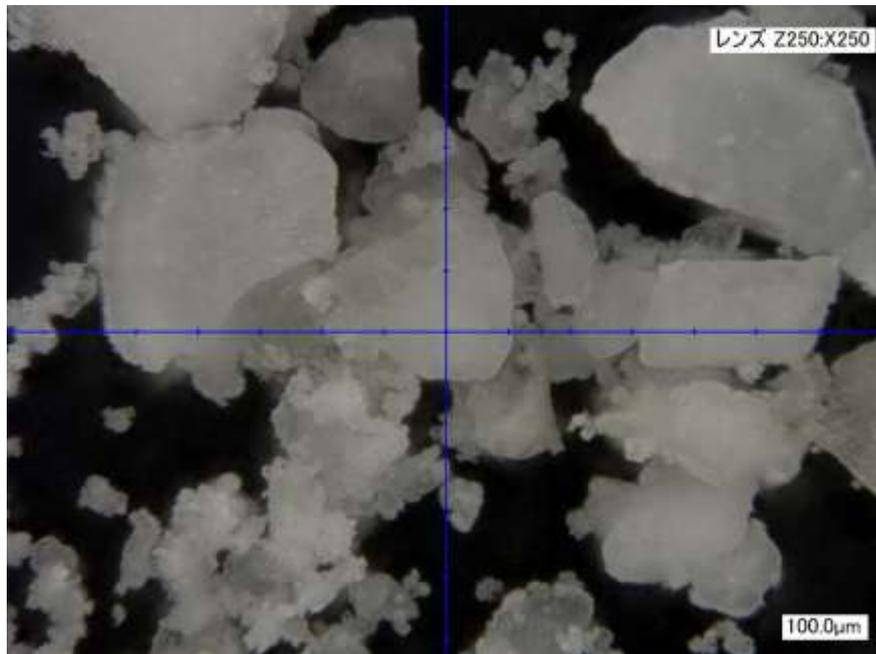


図6 100°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真

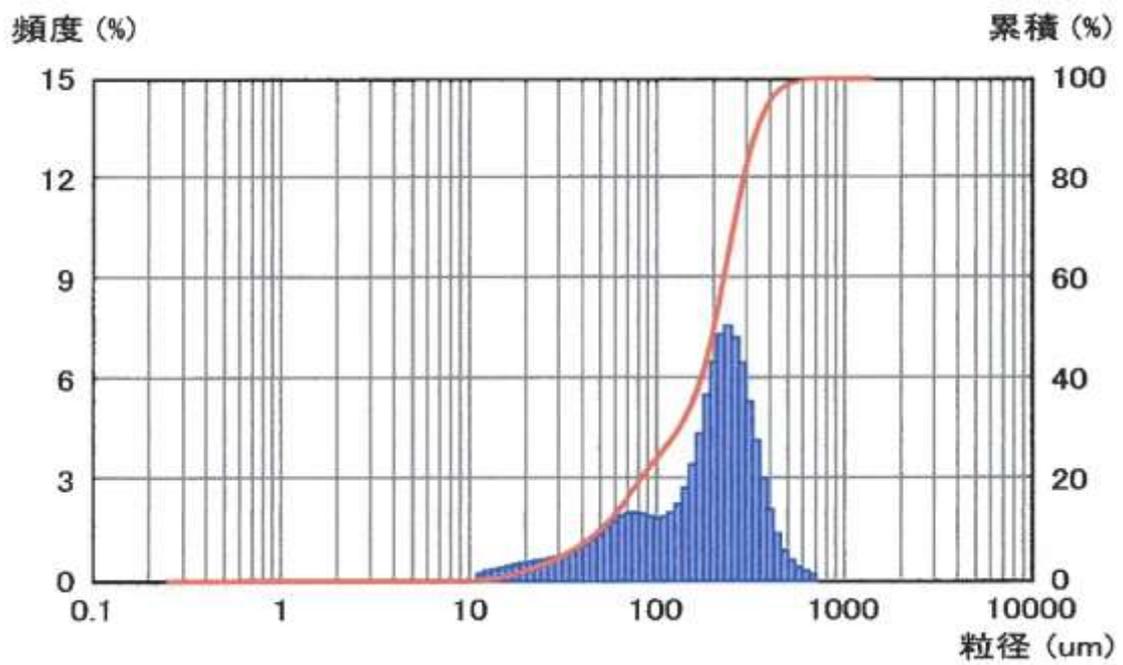
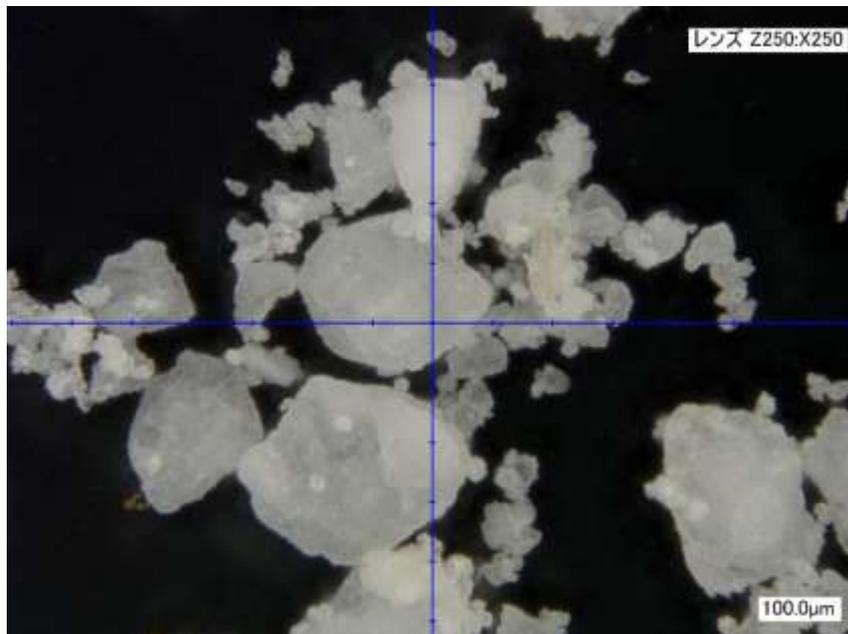


図7 80°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真

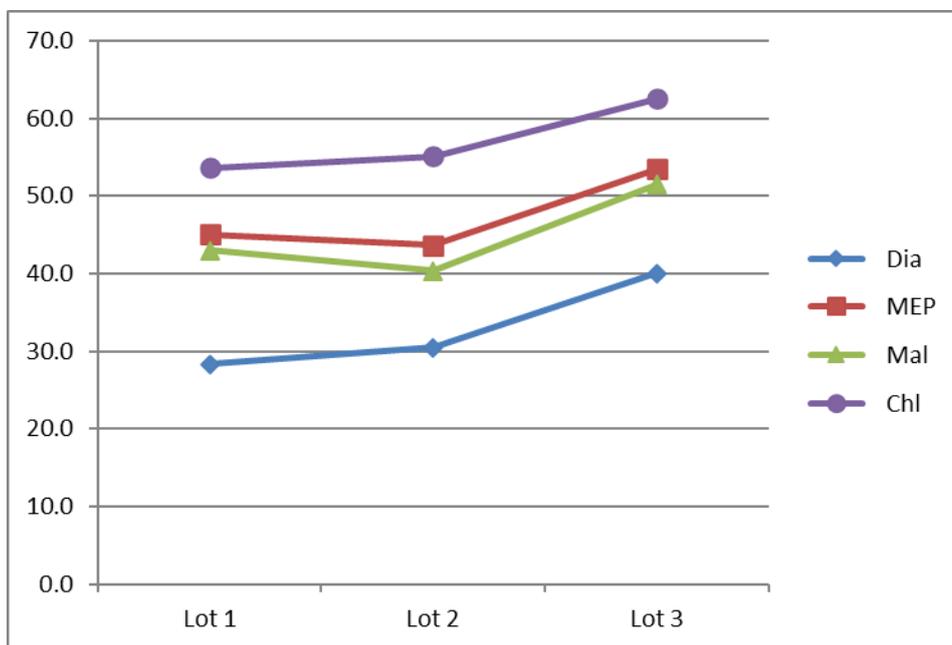


図8 噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率の比較 (40%アセトニトリル)

Lot1:120°C、Lot2:100°C、Lot3:80°C

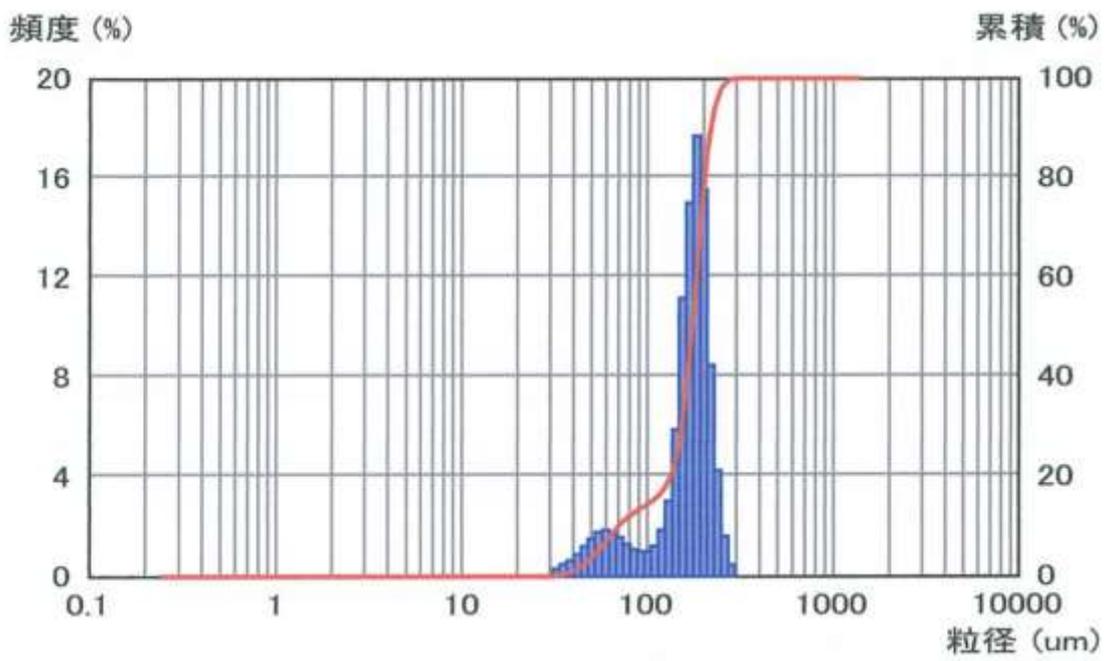
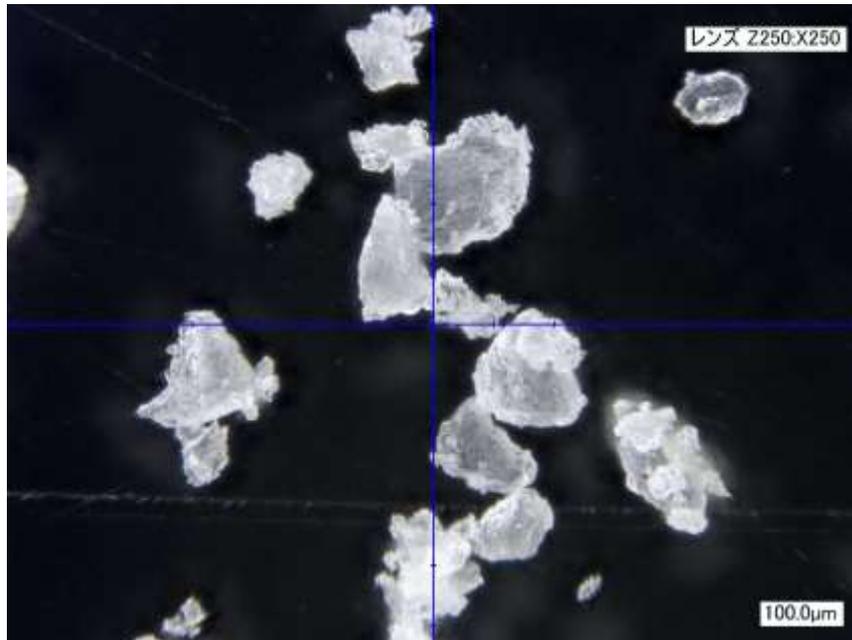


図9 自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真

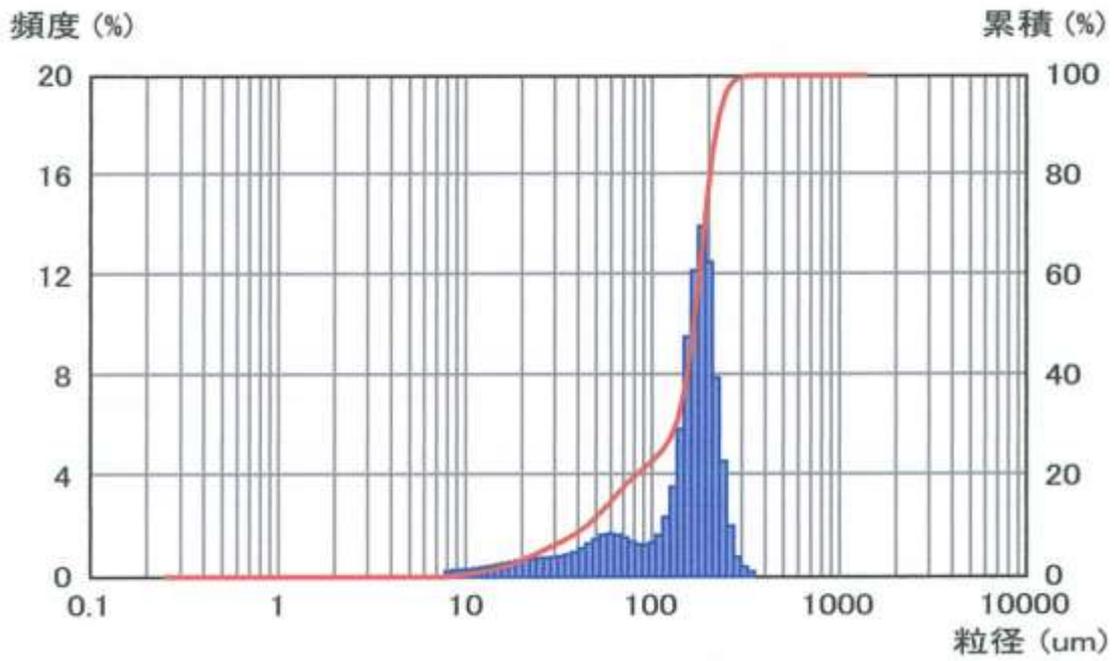
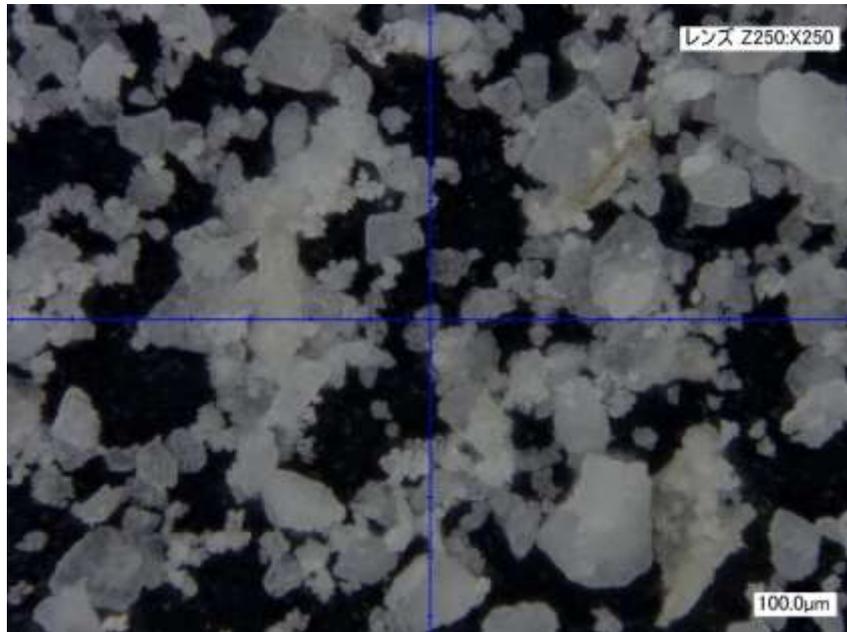


図10 120℃で噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真

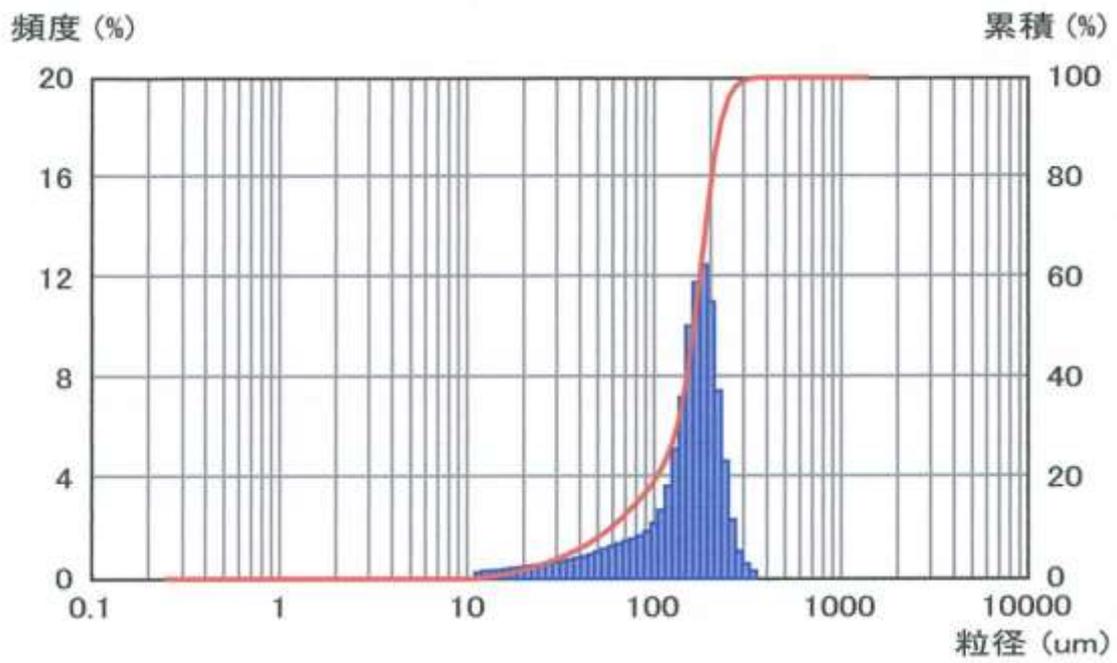
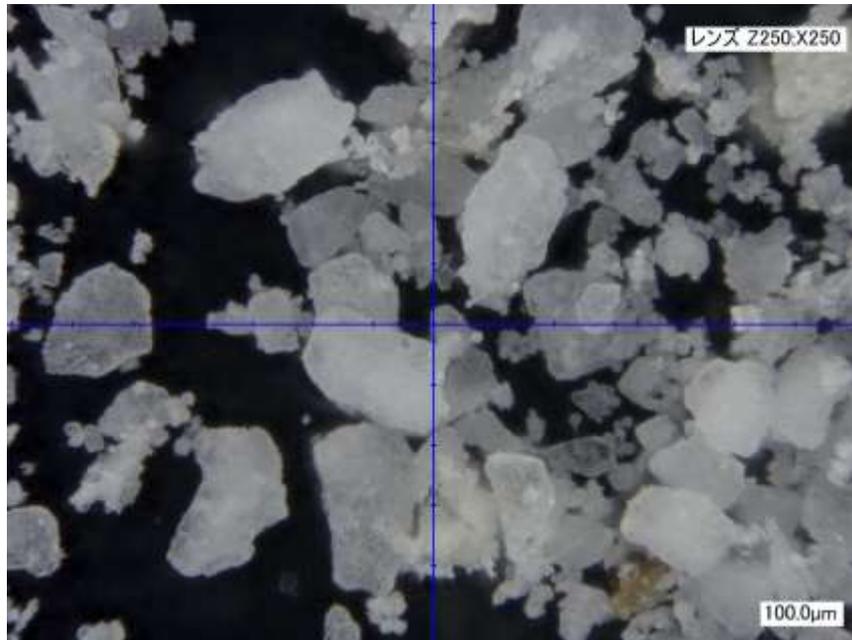


図11 100°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真

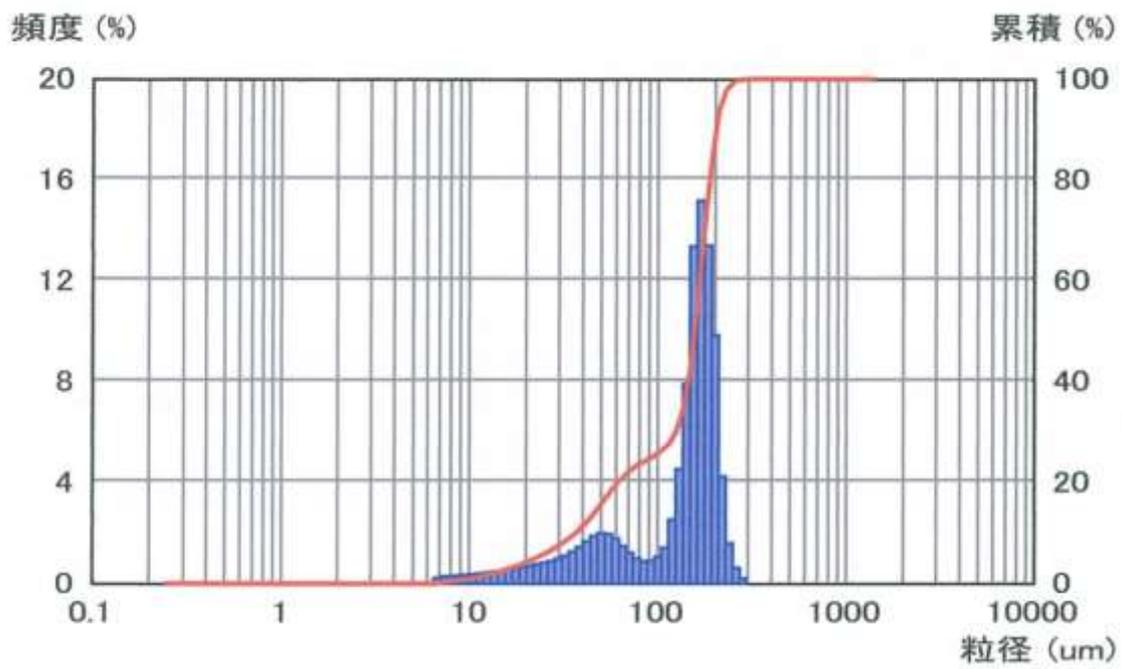
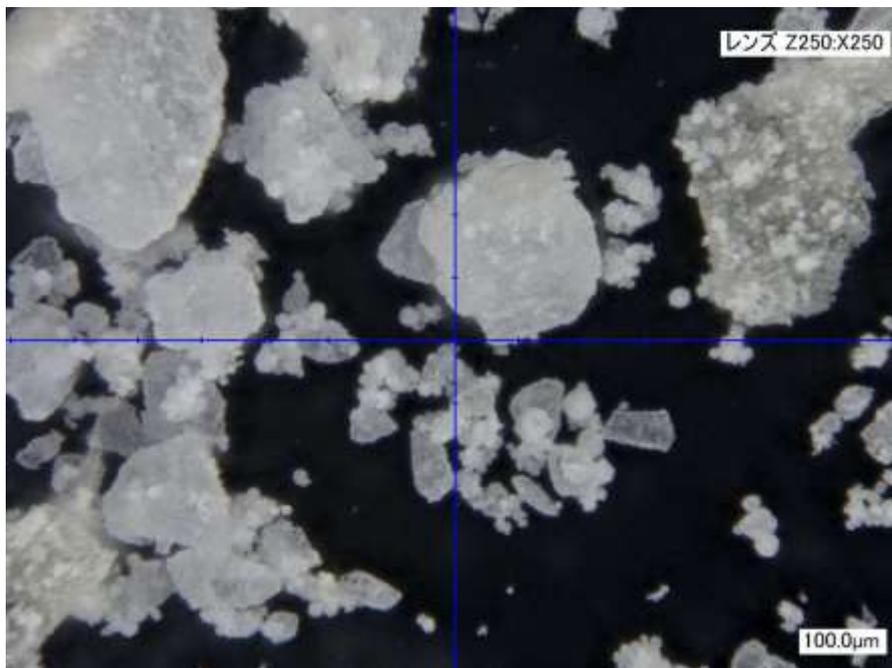


図12 80°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究  
－器具・容器包装の原材料の材料別規格に関する調査試料作製検討(2)－

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	部長
研究分担者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	部長
研究協力者	高坂 典子	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	室長
	平林 尚之	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	八木 真美	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	久保田佳子	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	西垣 嘉人	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	池田 真季	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	研究員

#### 研究要旨

食品衛生法第4条6項に、食品衛生とは、食品、添加物、器具及び容器包装を対象とする飲食に関する衛生をいうと定義されており、器具・容器包装は食品衛生の3本柱の1つと言える。これまでは、この食品衛生法第7条1項及び第10条の規定に基づき制定される「食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）」で定める食品中の残留農薬基準や添加物の使用（残留）基準を参考に外部精度管理調査のための実施プログラムを検討してきた。今回初めて「器具・容器包装」を対象に新たな外部精度管理調査プログラムの実施を試みるべく調査試料作製の基礎的検討を開始した。

まず、食品衛生法において個別規格があるプラスチックの材質ポリマーについて、作製上の必要要件である有機溶媒への溶解性を検討した。その結果、ポリスチレン、ABS及びASのペレットが溶解する溶媒が明らかとなり、今年度はポリスチレンペレットを試料基材とし、試験対象物質をカドミウム及び鉛として、溶解溶媒にジクロロメタンを用いて、作製検討を行った。添加に用いる標準品は有機溶媒に溶解するSPEX製カドミウム及び鉛（いずれも5000 µg/g、Base Oil 75）を用いた。ポリマー質量に対して10倍容量のジクロロメタンに、この標準品を添加して均質な溶液を調製し、これにポリマーを添加し、混合して十分にポリマーを溶解した（ポリマー溶液）。これをシート作製容器に流し入れ、垂平に保ちながらジクロロメタンを自然乾燥にて揮発し、シート状の試料を得て、これらのカドミウム及び鉛含量を測定し、理論作製濃度（50 µg/g）への回収率及び均質性を確認した。1シートを20分画しそれぞれの分画についてn=1でカドミウム及び鉛を測定した結果、いずれも理論値に対して94.1～102.7%の回収率が得られた。またこのときの相対標準偏差

(n=20) はカドミウム及び鉛のいずれにおいても 5%以下であり、シート内のカドミウム及び鉛の均質性も良好であった。しかしながら、ポリマーの溶解溶媒に用いたジクロロメタンがポリマー質量当たり約 1~3%残存する可能性が明らかとなった。また、ジクロロメタンの残留量は、カドミウム及び鉛の濃度に影響する可能性が示唆され、本作製法においてはジクロロメタン残留量の管理及び除去法の検討が必要であると考えられた。

## A. 研究目的

厚生省告示第370号で規定される器具及び容器包装に関する規格基準には、「A 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料一般の規格」、「D 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料の材質別規格」、「E 器具又は容器包装の用途別規格」及び「F 器具及び容器包装の製造基準」があり、この中でも「D 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料の材質別規格」の合成樹脂製器具・容器包装の全合成樹脂に共通して規定される材質試験としてのカドミウム及び鉛の規格に着目して、当該基準の外部精度管理調査プログラム用調査試料の作製を検討した。

## B. 方法

### 1. 試料基材、器材、試薬及び標準品

各ポリマーの有機溶媒への溶解性の検討用試料基材に、PET 樹脂製品として、PET DISPOSABLE RESERVOIR (アズワン) 及び NYTAL SEFAR、発泡スチロール (以下、発泡 PS) 製品として、食品用トレイ及び発泡ビーズ (金鶏)、ポリスチレン (以下、PS) ペレットとして PSJ-ポリスチレン (PS ジャパン)、ABS ペレットとしてデンカ ABS、AS ペレットとして STYLAC™-AS、ポリプロピレン (以下、PP) ペレット及びポリエチレン (以下、PE) ペレットを用いた。

調査試料作製用器材に、ディスポトレイ DT-3 (以下、トレイ大、PP 製、200×140×25 mm、内容量 約 700 mL、アズワン) 及びディスポトレイ DT-1 (以下、トレイ小、PP 製、100×70×13 mm、内容量 約 100 mL、アズワン) を用いた。

試料基材溶解検討用溶媒 (以下、溶解溶媒) として、フェノール (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、1,1,2,2-テトラクロロエタン (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、1,2-ジクロロベンゼン (東京化成工業)、*o*-クロロフェノール (鹿 1 級、関東化学)、ジクロロ酢酸 (鹿特級、関東化学)、ヘキサン (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、アセトン (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、テトラヒドロフラン (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、ジクロロメタン (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、メチルシクロヘキサン (和光特級、富士フィルム和光純薬)、2,2,4-トリメチルペンタン (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、ヘプタン (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、キシレン (和光特級、富士フィルム和光純薬)、酢酸ブチル (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、クロロホルム (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、シクロヘキサン (和光特級、富士フィルム和光純薬)、トルエン (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、4-メチル-2-ペンタノン (以下、

メチルイソブチルケトン、原子吸光分析用、富士フイルム和光純薬) 及び 2-ブタノン (以下、メチルエチルケトン、試薬特級、富士フイルム和光純薬) を用いた。

ポリマーに添加する標準品として、カドミウムは 5000 µg/g Cadmium (Base Oil 75、SPEX CertiPrep)、鉛は 5000 µg/g Lead (Base Oil 75、SPEX CertiPrep) を用いた。

各元素の濃度測定における標準品として、カドミウム標準液及び鉛標準液 (いずれも 1000 mg/L、化学分析用、関東化学) を用いた。

各元素の濃度測定試薬として、注射用水 (日本薬局方、光製薬)、硝酸 1.38 (以下、硝酸、有害金属測定用、関東化学)、塩酸 (有害金属測定用、関東化学) 及び硫酸 (有害金属測定用、関東化学) を用いた。

## 2. 使用機器及び測定条件

調査試料作製用機器として、Fisher Scientific 製 マグネチックスターラー (Isotemp) を用いた。

試料溶液の調製には、アズワン製セラミックホットプレート (以下、ホットプレート、CHP-250AF) 及びデンケン製マッフル炉 (以下、電気炉、KDF S100型) を用いた。

試料溶液中のカドミウム及び鉛の測定は、島津製作所製原子吸光分光光度計 (島津 AA7000) を用いた。

原子吸光分光光度法測定条件を以下に示す。

原子化方式：フレイム方式

使用ガス：可燃性ガス (アセチレン)

支燃性ガス (空気)

ランプ：カドミウム中空陰極ランプ  
鉛中空陰極ランプ

波長：228.8 nm (カドミウム)

283.3 nm (鉛)

点灯モード：BGC-D2法

スリット幅：0.7 nm

秤量には、メトラー・トレド製電子天秤 (PR803) を用いた。

## 3. 作製条件の検討

### 1) 試料基材及び溶解溶媒の選定

各ポリマーの有機溶媒への溶解性の検討を以下のとおりに行った。

各溶解溶媒 1 mL に対し細切した各ポリマー 0.1 g を加え、室温にて静置し時々攪拌、または 65°C の水浴中に浸漬し時々攪拌し、ポリマーの溶解状態の観察を行った。更に溶解したポリマーについて、10 倍容量の溶解溶媒を添加してポリマーを溶解し、十分に混合した溶液 (以下、ポリマー溶液) を調製後、トレー小に適量を分注し、アルミ箔で蓋をして溶解溶媒を自然乾燥にて揮発し、成形したシートの状態について観察した。

### 2) ポリマー溶液調製 (ポリマー含量) の検討

溶解したポリマーと溶解溶媒の組み合わせ (PSペレットとジクロロメタン) について、ポリマー質量に対する溶解溶媒量を検討した。

ポリマー溶液の調製におけるポリマー含量を約 5、10、15、20w/v% として、溶解性および成形性について目視観察した。

### 3) 作製容器へのポリマー溶液分注量の検討

シート作製時のポリマー溶液の分注量

について、作製したシートの状態を観察した。

ポリマー溶液を50、100、200、300、500 gずつトレー大に分注し、成形性について目視観察した。

#### 4) シート内の均質性評価

トレー大及びトレー小に、カドミウム及び鉛がポリマー質量当たり50 µg/g（溶媒が完全に除去された場合に調査試料に期待される濃度、以下、理論作製濃度50 µg/g）となるように調製したポリマー溶液を、トレー大に200 g、トレー小に50 g分注し、溶解溶媒を自然乾燥にて揮発後、シートの状態を観察し、カドミウム及び鉛の濃度を測定した。

試験方法については、5.1)の方法を用いた。

#### 5) 溶解溶媒除去条件の検討

ポリマー溶液をシート作製容器に分注し、目視にてシート成形を確認後、ドライヤー、ウィンディオーブン、電子レンジ、ホットプレート、真空乾燥器及びデシケータ（シリカゲル）を用いて乾燥した後、シートの質量を秤量し、溶解溶媒が除去できる方法について検討した。

#### 6) ジクロロメタン含量とカドミウム及び鉛含量の測定

シート状に成形した調査試料について厚みが異なる部位（約1 mm及び約0.5 mm）を採取し、ジクロロメタン（残留溶媒）含量とカドミウム及び鉛の含量を測定した。なお、ジクロロメタン含量、カドミウム及び鉛含量の測定については、食品衛生法上の登録検査機関に外部委託した。

### 4. 調査試料の作製

作製法の概略を図1に示す。

試料基材のポリマー質量に対して10倍容量の溶解溶媒をとり、これにカドミウム及び鉛標準液を添加し、均質な標準溶液添加溶解溶媒を調製した。これにポリマーを添加し、溶解して均質なポリマー溶液を調製した。シート作製容器（トレー大）に分注し、溶解溶媒を自然乾燥により揮発し、シート状の調査試料を作製した（理論作製濃度50 µg/g）。

### 5. 調査試料の品質評価

#### 1) 調査試料のカドミウム及び鉛濃度測定

試験は、「食品衛生検査指針 理化学編 2015 第11章 器具・容器包装 試験法 D 金属試験法 3. カドミウム及び鉛 (1) 公定法（材質試験）に準拠した。

試料0.5 gを石英製のつぼに採取し、硫酸2 mLを加え、徐々に加熱し、さらに硫酸の白煙がほとんど出なくなり大部分が炭化するまで加熱した（ホットプレート）。これを450°Cで5時間、電気炉にて加熱し、灰化し、得られた残渣に塩酸（1+1）5 mLを加えて混和後、加熱し、緩やかに乾固した（ホットプレート）。冷後、0.1 mol/L硝酸を適量添加し、溶解後、更に0.1 mol/L硝酸を用いてろ過（No.6）しながら20 mLとし、鉛測定溶液とした。鉛測定溶液を2 mLとり、0.1 mol/L硝酸を加えて10 mLとし、カドミウム測定溶液とし、2.に示す測定条件で原子吸光分光光度計により測定を行った。

別に、添加標準溶液を適宜採取し、測定溶液の調製と同様に操作し、添加標準溶液測定溶液とし、試料測定溶液と同様

に測定した。

## 2) 調査試料の均質性評価

理論作製濃度50 µg/gとなるように調製したポリマー溶液を用いてシートを作製した(約200×140 mm)。

調査試料の配付形態を想定し、得られたシートの周囲は採用しないため切り取り、切り取り後のシートを20分画し、各分画を各々細切均質化し、各分画n=1で測定を行い、n=20のばらつきについて評価した。

(倫理面への配慮)

特定化学物質(第2類分類)の使用に際し、使用者への暴露、発散及び漏洩の防止に努めた。

## C. D. 研究結果および考察

### 1. 作製条件の検討

#### 1) 試料基材及び溶解溶媒の選定

結果を表1に示す。

試料基材として、9種類のポリマー及び溶解溶媒として19種類の有機溶媒について検討した。

PET樹脂については、使用した製品により溶解性が異なる結果となった。フェノール系ハロゲン溶媒との混液に対し、DISPOSABLE RESERVOIR製のポリマーでは溶解が可能であったが、NYTAL SEFAR製のポリマーではほとんどの溶解溶媒に溶解しなかった。また、溶解溶媒によりシート成形後の状態が不良または成形状態が良好であっても溶媒臭が残り、使用に不適切であると考えられた。

異なるメーカーの製品を用いた発泡PSは、いずれもシート成形の際に内包され

ていた気泡が発生し、表面がまだら状になったため仕上がりに問題があった。

PSペレット、ABSペレット及びASペレットについては、溶解条件が明らかとなった。

PPペレット及びPEペレットについては、検討した条件ではポリマー溶解は不可であり、更なる有機溶媒や溶解温度等の検討が必要であることが考えられた。

以上の結果より、今年度は試料基材としてPSペレットを、溶解溶媒としてジクロロメタンを用いて調査試料作製検討を行った。

#### 2) ポリマー溶液調製(ポリマー含量)の検討

まず、溶解溶媒に対してポリマー質量の割合が約5、10、15、20w/v%となるポリマー溶液を調製し、トレー大に分注し、自然乾燥による溶媒揮発後のシート成形の状態を観察した。その結果、5w/v%は揮発する溶媒量が多く成形に時間を要すること、また調査試料としての配付量を確保するためにはシート作製容器に分注する量が多くなること、更に15~20w/v%はポリマーの溶解に時間を要する上に溶媒が揮発しにくいことなどから、10w/v%が最も良好であると考えられた。

#### 3) 作製容器へのポリマー溶液分注量の検討

ポリマー質量に対して10倍容量の溶解溶媒を添加してポリマーを溶解したポリマー溶液について、シート作製容器にてトレー大を用いて分注量を検討することとした。

トレー大にポリマー溶液を50、100、200、300、500 gずつ分注し、自然乾燥に

よる溶媒揮発後のシート成形の状態を観察した結果、100 g及び200 gの分注が良好であった。調査試料としての配付量を確保することを考慮し、200 gの分注（ポリマー質量 20 g）とした。

#### 4) シート内の均質性評価

結果を表2に示す。

トレー大に分注して得られたシート2枚につき各々3分画（a～c）し、各分画を各々細切均質化し、各n=1で測定を行った。各シートにおける3分画についてのばらつきはいずれも5%以下であり、シート内のカドミウム及び鉛濃度はおおよそ均質であると考えられた。トレー小に分注して得られたシート3枚についてシートの状態を観察したところ、3枚ともシートが厚い部分（約1 mm）と薄い部分（約0.5 mm）が生じていた。そこで、各シートを各々厚い部分と薄い部分に切り分け、各部分を各々細切均質化し、各n=1で測定を行った。その結果、カドミウム及び鉛濃度はいずれも、シートが厚い部分の回収率が薄い部分と比較して低い結果であった。

シートの厚みの差により、回収率に影響が生じることが考えられたため、トレー大にポリマー溶液を分注し、故意に厚い部分と薄い部分が生じるようにシートを作製した。得られたシートについて厚い部分と薄い部分に切り分け、各々細切均質化し、各n=3で測定を行った。その結果、カドミウム及び鉛濃度はいずれも、シートが厚い部分の回収率が薄い部分と比較して低い結果であった。シートを自然乾燥して溶媒を揮発する際に、薄い部分と厚い部分では乾燥の程度に差があり、厚い部分には溶解溶媒が残存しているた

め、実質採取した試料量が少なくなり、回収率の低下の要因となったと考えられた。これらの結果より、溶解溶媒の除去が重要であると考えられた。

なお、いずれの測定においても、標準品につき同様に調製を行った溶液の濃度に対する回収率（%）としての評価を行った。

#### 5) 溶解溶媒除去条件の検討

結果を図2に示す。

目視にてシート成形を確認し、ドライヤー、ウィンディオープン、電子レンジ及びホットプレートを用いて加温乾燥したところ、いずれも質量は変化なし、または増加した。原因の詳細は不明であるが、加温による処理は効果が認められなかった。この結果より、常温における処理方法について検討した。まず、真空乾燥器で5時間真空乾燥（常温）した結果、顕著な効果は認められなかった。次に、デシケータ（シリカゲル）内静置による効果について評価した。成形後のシート質量と成形後のシート質量理論値（20 g）の差をジクロロメタン残留量（以下、残留溶媒量）と仮定し、この成形後のシート質量変化を測定した。ドラフト内からデシケータ（シリカゲル）内へ移設し、残留溶媒量の変化を評価したところ、急激に残留溶媒量が減少し、デシケータ（シリカゲル）内放置の効果が確認できた。残留溶媒量の限度値は、ジクロロメタンの残留溶媒としての限度値である600 ppm（参考：第17改正日本薬局方、2.46残留溶媒）より、シート質量理論値20 gに対して0.012 gとなる（ $20 \text{ g} \times 0.06\%$ ）。デシケータ（シリカゲル）内で約1か月間放置し

たが、シート質量理論値20 gに対しては残留溶媒量約0.2 gでほぼ一定となった。この時点で溶解溶媒除去は限界に達したと考え、シート成形後デシケータ（シリカゲル）内で約1か月放置後の調査試料について均質性の評価を行うこととした。

#### 6) ジクロロメタン含量とカドミウム及び鉛含量の測定

結果を表3に示す。

ジクロロメタン含量は、シートが厚い約1 mmの3部位について各n=2で測定した結果は2.19～3.41%、またシートが薄い約0.5 mmの2部位について各n=2で測定した結果は1.29～2.45%であり、シートが厚い試験部位の方が薄い試験部位よりジクロロメタン含量が高い傾向であった。

一方、カドミウム含量は、シートが厚い約1 mmの3部位について各n=2で測定した結果は44～47 µg/g、またシートが薄い約0.5 mmの2部位について各n=2で測定した結果は40～57 µg/gであった。シートが薄い1部位についてはn=2の結果が他の2併行と比較してばらつきが大きい結果となったが、シートが薄い試験部位の方が厚い試験部位よりもカドミウム含量が高い傾向であった。

鉛含量については、シートが厚い約1 mmの3部位について各n=2で測定した結果は43～47 µg/g、またシートが薄い約0.5 mmの2部位について各n=2で測定した結果は34～55 µg/gであった。カドミウムと同様に、シートが薄い1部位についてはn=2の結果が他の2併行と比較してばらつきが大きい結果となったが、シートが薄い試験部位の方が厚い試験部位よりも鉛含量が高い傾向であった。

カドミウム及び鉛含量については、いずれの厚さの試験部位においても理論作製濃度50 µg/gに対して、カドミウムが92～98%、鉛は88～98%の良好な回収率であった。

以上の結果より、シートが薄い試験部位と比較して厚い試験部位の方が、ジクロロメタン含量が高く、一方でカドミウム及び鉛含量は低い傾向が明らかとなり、シート中のジクロロメタン含量がカドミウム及び鉛含量（濃度）に影響を及ぼすことが示唆された。今後はジクロロメタン含量とカドミウム及び鉛含量の相関性や、ジクロロメタン含量をシートの厚みで管理する方法の検討が必要であると考えられた。

## 2. 調査試料の作製

調査試料作製法の概略のとおり、シート状の調査試料を作製した。これを以下に示す品質評価に用いた。

## 3. 調査試料の品質評価

### 1) 調査試料のカドミウム及び鉛濃度測定

B.5.1)に示す方法を用いて測定溶液等を調製した。

### 2) 調査試料の均質性評価

各試料の測定結果を表4、均質性評価結果を表5に示す。

1シートを20分画しそれぞれの分画についてn=1でカドミウム及び鉛濃度を測定した。その結果、ポリマー質量当たり添加標準溶液測定濃度に対する回収率は94.1～102.7%であった（表4）。また、このときの相対標準偏差（n=20）は5%以下であった（表5）。この結果より、シート内のいずれ

のカドミウム及び鉛濃度も均質であると考えられた。なお、同分画で対応するカドミウムおよび鉛の測定結果の差は、測定のばらつきの範囲内であり、相関性は見られなかった。

#### E. 結論

「食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）」で定める「器具・容器包装」の規格として、全合成樹脂に共通して規定される材質試験におけるカドミウム及び鉛の外部精度管理調査プログラム用調査試料の作製を検討した。試料基材にポリスチレンペレットを、また試料基材の溶解溶媒にジクロロメタンを用い、オイル系の標準品を添加し、溶解溶媒を自然乾燥にて揮発して、シート状の試料を作製した。ジクロロメタンが部位により約1~3%残留する可能性が示唆されたが、カドミウム及び鉛の理論作製濃度に対して約94~103%の回収が得られ、1シート内の良好な均質性が確認できた。今後は本法においては残留溶媒含量とカドミウム及び鉛含量の相関性の確認を行い、残留溶媒含量をより低くする方法を検討する。更に複数ロット間のばらつきの検討の他、スプレードライヤを用いる別の作製方法による可能性も含めて検討を行う必要がある。

#### F. 健康危険情報

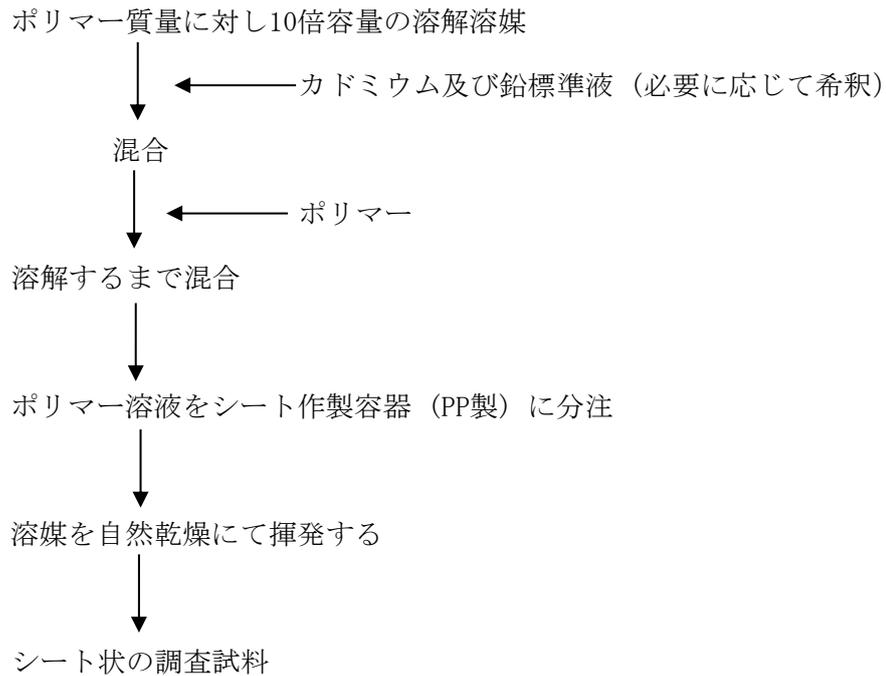
ポリマーの溶解溶媒にジクロロメタン等の特定化学物質（第2類物質）を使用した。安全保護具を着用の上、局所排気装置内で全操作を行った。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

#### H. 知的所有権の取得状況

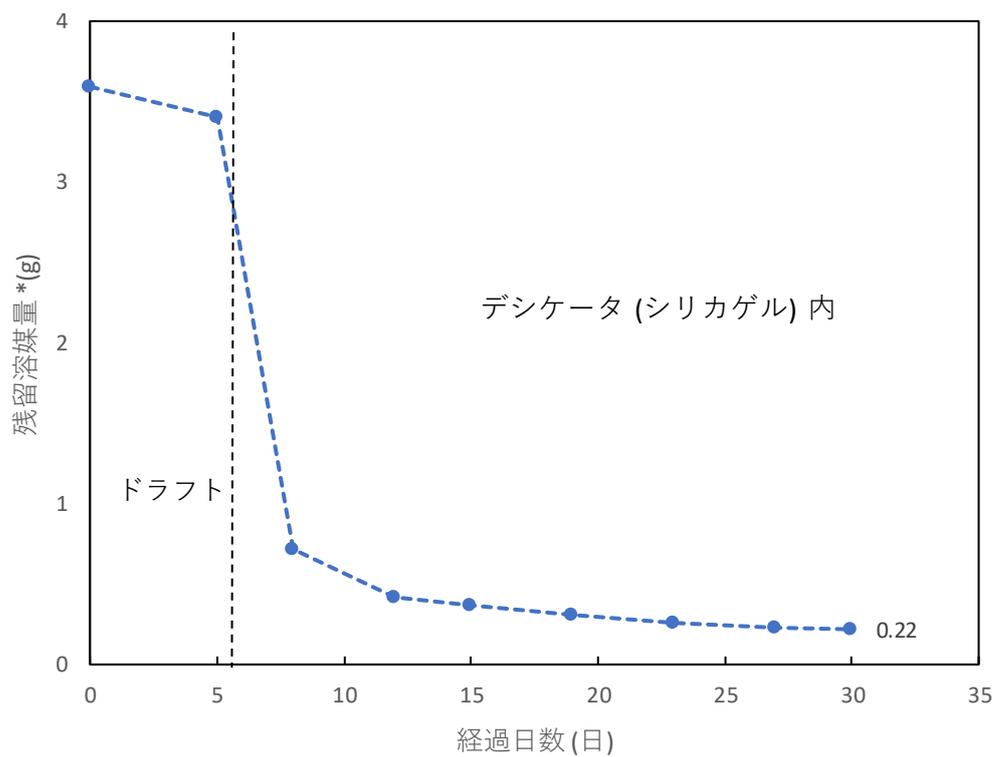
1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他



理論作製濃度：カドミウム及び鉛 50 µg/g

(参考：合成樹脂一般の材質試験基準値 カドミウム；100 µg/g以下、鉛；100 µg/g以下)

図1 調査試料作製法の概略



\*: 残留溶媒量 = 成形後のシート質量 - 成形後のシート質量理論値 (20g)

図2 調査試料成形後のシート質量変化

表1 ポリマー及び溶解溶媒の選定

試料基材	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰	⑱	⑲			
a	RT	○	×	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	HW	○	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	成形	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良								
b	RT	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	HW	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	成形	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c	RT	-	-	-	-	×	×	×	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	HW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	成形	-	-	-	-	-	-	-	揮発不良 成形後ま だら模様	揮発良好 成形後ま だら模様	揮発不良 成形後ま だら模様											
d	RT	-	-	-	-	×	×	×	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	HW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	成形	-	-	-	-	-	-	-	揮発不良 成形後 気泡発生	揮発良好 成形後 気泡発生	揮発不良 成形後 気泡発生											
e	RT	-	-	-	-	-	×	×	○	○	-	-	-	-	×	×	×	×	×	×	×	×
	HW	-	-	-	-	-	×	○	○	○	-	-	-	-	○	○	○	○	○	○	○	○
	成形	-	-	-	-	-	-	揮発不良 成形良好	揮発不良 成形良好	揮発良好 成形良好	揮発不良 成形良好											
f	RT	-	-	-	-	-	○	○	○	○	-	-	-	-	×	×	×	×	×	×	×	×
	HW	-	-	-	-	-	-	○	○	○	-	-	-	-	○	○	○	○	○	○	○	○
	成形	-	-	-	-	-	-	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	
g	RT	-	-	-	-	-	×	×	×	×	-	-	-	-	×	×	×	×	×	×	×	×
	HW	-	-	-	-	-	○	○	○	○	-	-	-	-	○	○	○	○	○	○	○	○
	成形	-	-	-	-	-	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	
h	RT	-	-	-	-	-	×	×	×	×	-	-	-	-	×	×	×	×	×	×	×	×
	HW	-	-	-	-	-	×	×	×	×	-	-	-	-	×	×	×	×	×	×	×	×
	成形	-	-	-	-	-	-	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	
i	RT	-	-	-	-	-	×	×	×	×	-	-	-	-	×	×	×	×	×	×	×	×
	HW	-	-	-	-	-	×	×	×	×	-	-	-	-	×	×	×	×	×	×	×	×
	成形	-	-	-	-	-	-	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	揮発良好 成形不良	

RT：室温 HW：65°C ○：溶解 ×：溶解不可 -：未実施

試料基材の溶解

①～⑩各1mLに試料基材(細かく破砕)0.1gを加え、以下の条件で溶解の状態を観察

1) 室温静置で時々攪拌

2) 水浴(65°C)中に浸漬し、時々攪拌

試料基材	a	b	c	d	e	f	g	h	i
PET樹脂	PET								
PET DISPOSABLE RESERVOIR	PET								
NYTAL SEFAR	NYTAL								
食品用トレイ	食品用								
発泡ビーズ(金箔)	発泡								
PSJ-ポリスチレン	PSJ								
デンカABS	デンカ								
STYLAC <sup>TM</sup> AS	STYLAC								
メチルメタクリレート	メチル								
2,2,4-トリメチルペンタン	2,2,4-トリ								
シクロヘキササン	シクロ								
ヘプタン	ヘプ								
キシレン	キシ								
酢酸ブチル	酢酸								
クロロホルム	クロ								
トルエン	トル								
メチルイソブチルケトン	メチル								
メチルエチルケトン	メチル								

**表2 シート内の均質性評価**

シートNo.	採取位置	回収率*1(%)	
		Cd	Pb
トレ-大1	a	84.7	94.7
	b	82.9	95.5
	c	89.9	93.8
平均値 (%)		85.8	94.7
標準偏差 (%)		3.64	0.850
相対標準偏差 (%)		4.2	0.9
トレ-大2	a	86.5	92.2
	b	89.2	93.0
	c	90.8	90.8
平均値 (%)		88.8	92.0
標準偏差 (%)		2.17	1.11
相対標準偏差 (%)		2.4	1.2
トレ-小1	薄	92.6	98.5
	厚	92.3	92.2
トレ-小2	薄	94.1	93.0
	厚	91.9	86.7
トレ-小3	薄	87.6	101.8
	厚	88.3	89.2
トレ-大3	薄-1	91.2	98.2
	薄-2	92.6	99.4
	薄-3	91.6	98.2
平均値 (%)		91.8	98.6
標準偏差 (%)		0.721	0.693
相対標準偏差 (%)		0.8	0.7
トレ-大3	厚-1	84.4	97.2
	厚-2	86.0	94.6
	厚-3	86.2	95.0
平均値 (%)		85.5	95.6
標準偏差 (%)		0.987	1.40
相対標準偏差 (%)		1.2	1.5

\*1：ポリマー質量当たり添加標準溶液測定濃度に対する回収率

表3 シート内におけるジクロロメタン含量、カドミウム及び鉛含量測定結果

試験部位	併行分析数	ジクロロメタン		Cd			Pb		
		含量 (%)	平均値 (%)	試料中濃度 (µg/g)	平均値 (µg/g)	回収率*1 (%)	試料中濃度 (µg/g)	平均値 (µg/g)	回収率*1 (%)
1	1	2.79	2.75	47	46	92	44	44	88
	2	2.71		44			43		
2	1	3.39	3.40	46	47	94	45	46	92
	2	3.41		47			47		
3	1	2.19	2.28	47	46	92	47	46	92
	2	2.36		45			45		
4	1	2.45	2.25	40	49	98	34	45	90
	2	2.04		57			55		
5	1	1.29	1.41	49	49	98	49	49	98
	2	1.53		49			48		

それぞれ厚みが異なる試験部位において、各n=2で測定を行った(試験部位1~3:厚み約1 mm、4及び5:厚み約0.5 mm)

\*1: 平均濃度を理論作製濃度 (50 µg/g) で除した百分率

**表4 均質性確認測定結果**

**Cd**

試料No.	試料中濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 <sup>*1</sup> (%)
1	41.2	95.5
2	43.6	101.1
3	43.6	101.1
4	42.7	99.0
5	43.0	99.7
6	43.5	100.9
7	44.3	102.7
8	44.2	102.5
9	43.4	100.6
10	42.3	98.1
11	42.2	97.9
12	42.2	97.9
13	43.2	100.2
14	41.1	95.3
15	43.2	100.2
16	43.1	100.0
17	42.9	99.5
18	43.6	101.1
19	42.2	97.9
20	42.7	99.0

**Pb**

試料No.	試料中濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 <sup>*1</sup> (%)
1	46.0	99.1
2	46.0	99.1
3	43.7	94.1
4	43.9	94.6
5	45.4	97.8
6	44.4	95.6
7	47.1	101.5
8	45.3	97.6
9	45.2	97.4
10	45.8	98.7
11	46.9	101.0
12	44.7	96.3
13	45.8	98.7
14	47.2	101.7
15	46.8	100.8
16	45.2	97.4
17	46.0	99.1
18	45.1	97.1
19	44.1	95.0
20	45.1	97.1

\*1：ポリマー質量当たり添加標準溶液測定濃度に対する回収率

**表5 均質性確認結果一覧**

	Cd	Pb
理論作製濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	50	
平均値 (%)	99.5	98.0
標準偏差 (%)	1.99	2.23
相対標準偏差 (%)	2.0	2.3

各々の試験において、秤量操作から各n=20で測定を行った

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究  
ー特定原材料検査（乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ（3）ー

研究代表者	渡辺 卓穂	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	部長
研究分担者	渡辺 卓穂	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	部長
研究協力者	若栗 忍	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	研究員

### 研究要旨

食物アレルギーは国民の食生活の変化に伴って変化しているため、疫学的調査を行い、実際の発症状況に即した行政的な対応が必要とされる。

アレルギー食品として重篤な反応を引き起こす特定原材料7種類については特に、加工食品中に含まれた場合、大きな健康被害へとつながる可能性があることから、表示義務がある。加工食品中の検査法の一つ、スクリーニング法としてのELISA法による定量試験のための外部精度管理調査試料の安定供給は重要である。

本年度はパイロットスタディには乳タンパク質を10 µg/g添加した試料（基材としてベビーフードおよび10%精製水含有こしあん）を用い、定量試験法であるELISA法について外部精度管理調査研究を実施した。参加機関は31機関で、原則として消費者庁から提示されている3キット中任意の2種類で測定を行うこととした。参加機関から得た測定結果は試料ごと、および測定キットごとにまとめ、メジアン・クリーニン（MC）後、ロバスト方式により統計値を算出し、それらの数値を用いて $\sigma$ スコアを算出した。また、 $\bar{X}$ - $R$ 管理図を用いた解析も同時に行った。

その結果、MCにより除外された機関はなく、また、 $\sigma$ スコアの絶対値が3以上となる機関は各解析ごとに0~1機関認められた。 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線の範囲を超える機関はなく、 $R$ 管理図では管理限界線を超える機関は各解析ごとに0~1機関認められた。

また、パイロットスタディの試料作製に先立ち、試料作製に関する予備検討を行った。

## A. 研究目的

食物アレルギーは国民の食生活の変化に伴ってそのプロファイルが変化する。そのため、疫学的調査を行い、実際の発症状況に即した行政的な対応が必要とされる。

アレルギー反応を引き起こす食物は多数存在するが、アレルギー患者が多い食品、重篤なアレルギー反応を引き起こす食品に関しては国民の健康への影響が大きいことから、特定原材料として食品表示法に従った適切な表示が義務付けられている。また、表示義務はないものの表示が推奨されている特定原材料に準ずるものについても、多くの企業で加工食品への表示をすることで、消費者の注意喚起を行っている。

特定原材料は7種類、特定原材料に準ずるものについては21種類があげられているが、原材料として使用していない、これらの食品が加工製品中に含まれた場合、健康被害へとつながる。

表示義務のある特定原材料については、加工食品中の検査法として、スクリーニング法としてELISA法による定量試験が、確認試験としてPCR法またはウェスタンブロットティング法による定性試験を行うことが消費者庁次長通知「食品表示基準について」（平成27年3月30日消食表第139号）（以下、通知法）、別添「アレルギーを含む食品の検査方法」に記載されており、その試験に際しては精度管理の一般ガイドラインに準じ、適切に業務管理を実施することが求められている。

スクリーニング試験であるELISA法の精度を管理することは、食品中のアレルギー物質を

適切に検出するために、重要であり、業務管理のツールとしての外部精度管理調査試料の安定供給は重要な課題である。

また、実務に合わせた種々の試料を作製、それらに対する試験結果を解析し、各機関に対してフィードバックを行うことはそれぞれの検査機関における精度管理の一助として有意義である。

本年度は、外部精度管理調査に関するパイロットスタディにおいて、特定原材料は乳を用いて試料の作製を行い、参加機関から回収したデータの解析を行った。

## B. 方法

### 1. 基材

基材にはベビーフードハッピーレシピ白身魚と野菜の雑炊（以下、ベビーフード、キューピー）、ベビーフードハッピーレシピ鮭のポテトクリーム煮（以下ベビーフード鮭、キューピー）、井村屋謹製こしあん（井村屋）、とうもろこしペースト（新進）、ファミリーカップイチゴジャム（以下イチゴジャム、ソントン）の5物質を使用した。

いずれの基材もELISA法を用いて乳が検出されないことを確認した。ELISA法に使用したキットについては「4. ELISAキット」参照。

### 2. 各種添加溶液の調製

#### 1) 添加用乳タンパク質の調製

特定原材料の乳検出用試料作製のため、各種基材を用いて検討を行った。

添加用の乳タンパク質としてスキムミルク（富士フイルム和光純薬工業）および北海道全粉乳（全粉乳、よつ葉乳業）を用いた。

スキムミルクまたは全粉乳を50-mLチューブに0.2 g分取後、0.6% SDS, 0.1 mol/L 亜硫酸ナトリウム含有PBS (pH 7.4) をチューブ当たり20 mL添加し、室温下で1晩振盪した。懸濁液は遠心 (10,000×g, 30 min) 後、上清を0.8 μm フィルターを用いてろ過し、添加用乳タンパク質調製液とした。

## 2) タンパク質量の測定

乳タンパク質調製液のタンパク質量は、2-D Quant Kit (Cytiva)を用いて測定した。得られたタンパク質量から調製液濃度又は添加量を計算し、適当量を各基材に添加した。添加量は総乳タンパク質量相当とした。

## 3. 試料調製

### 1) 添加用乳タンパク質の検討

乳タンパク質としてスキムミルクまたは全粉乳を用い、ベビーフード鮭及びびとうもろこしペーストを基材として検討用の試料を作製した。

添加用乳タンパク質調製液を10 μg/gとなるように添加量を計算後、各基材に加えた後、フードプロセッサー (MK-K58、National) を用いて均質化し、試料を作製した。各試料はそれぞれ約10 gずつ分注し、-20℃で凍結保存した。

### 2) 外部精度管理調査試料の予備検討

外部精度管理調査試料の予備検討として300 g 程度の小スケールで試料を作製し、安定性を確認した。

乳タンパク質としてスキムミルクを用い、基材に特定原材料を含まないとして市販されている、ベビーフードおよび井村屋謹製こしあん (試料作製時には10%の精製水を添加)を用い、前項「1)乳タン

パク質検討用試料の作製」同様に試料を作製した。

### 3) 外部精度管理調査試料の調製

外部精度管理調査試料には、前項で検討済みのベビーフードおよび井村屋謹製こしあんを基材に使用し、これにそれぞれ総乳タンパク量で10 μg/gとなるように添加用乳タンパク質溶液を添加した。

ベビーフードは、ロボ・クープブリスサー5プラス (エフ・エム・アイ) で粒がわからなくなるまで均質化後、添加用乳タンパク質溶液を添加した。井村屋謹製こしあんは10%の精製水を添加、ロボ・クープブリスサー5プラスで均質化したものを基材として (以下こしあん)、添加用乳タンパク質溶液を添加した。

各試料は約10 gずつ分注後、-20℃で凍結保存した。調査研究試料は試料1がベビーフード試料、試料2がこしあん試料とした。また、これらの試料について均質性および安定性の確認を行った。

## 4. ELISA法

特定原材料の乳タンパク質検出には、通知法のバリデーション要件を満たすELISAキットを使用した。また、バリデーションを行って位はいないが、森永生科学研究所のβ-ラクトグロブリン検出キットも使用した。

### 1) 乳タンパク質検出用キット

- FASTKITエライザVer. III牛乳 (日本ハム) (以下、日本ハムキット)
- モリナガFASPEK エライザII 牛乳 (カゼイン) (森永生科学研究所) (以下、モリナガ (カゼイン) キット)
- モリナガFASPEK エライザII 牛乳 (β-ラクトグロブリン) (森永生科学

研究所) (以下、モリナガ (BLG) キット)

- アレルゲンアイELISA II牛乳( $\beta$ -ラクトグロブリン)(プリマハム)(以下、プリマハムキット)

## 2) 乳タンパク質検討用試料のELISA試験

「3. 試料調製」「1) 乳タンパク質検討用試料の作製」で作製した4種の試料について、ELISA法により乳タンパク量の測定を行った。測定は、「1) 乳タンパク質検出キット」に記載の4種キットを用い、作製後0か月と6か月に行った。

## 3) 外部精度管理調査試料の予備検討

「3. 試料調製」「2) 外部精度管理調査試料の予備検討」で作製した試料は作製後0か月、1か月、3か月及び6か月に「1) 乳タンパク質検出キット」に記載の4種キットを用い、ELISA法による測定を行い、安定性を確認した。

## 5. 外部精度管理調査試料の均質性および安定性

外部精度管理調査用試料の品質評価として均質性および安定性の確認を行った。

均質性の確認は、試料作製後1ヶ月以内に行った。調査試料の各基材についてそれぞれ $n=10$ でサンプリングし、ELISA法により乳タンパク質濃度の測定を行い、平均値、標準偏差、変動係数を算出した後、均質性を判断した。また、均質性試験の結果を安定性試験の0ヶ月とした。安定性は調査期間後である、試料作製後4か月(調査期間後)に $n=4$ で試料を測定し、0か月の乳タンパク質含有量に対する数値を計算し、安定性をとした。

均質性試験および安定性試験は日本ハ

ムキット、プリマハムキット、モリナガ(カゼイン)キット、およびモリナガ

(BLG) キットの4種類のELISAキットを用いて測定した。使用したキットはすべて使用期限内であり、均質性と安定性で同ロットのものを使用した。

吸光度測定および濃度計算にはマイクロプレートリーダーEL 808IU (Bio-Tek Instruments, Inc.) および計算ソフトウェアDeltaSoft JV Ver. 1.80 (Bio-Tek Instruments, Inc.) を使用した。

## 6. 外部精度管理調査の実施

本年度は調査に参加した31機関へ2020年9月29日に調査試料と実施要領を宅配便(冷凍)にて送付した。

測定には、原則として各機関、日本ハムキット、プリマハムキット、モリナガ(カゼイン)キットのうち、任意の2種類を使用することとした。また、余力がある場合には通知法に未収載であるが、モリナガ(BLG)キットの測定についても依頼した。

測定に際しては原則各機関のSOPに従い、サンプリング数は1試料につき2抽出、ELISA測定は1抽出につき3ウェル併行とした。また、報告書の回収期限は2020年10月30日とした。

## 7. 外部精度管理調査結果の解析

通知法の別添「アレルゲンを含む食品の検査方法」中、別添4「アレルゲンを含む食品の検査方法を評価するガイドライン」の「4. 特定原材料検知法開発者が公表すべき検査方法の性能とその範囲に関する提言」に「免疫化学反応に基づく定量法では、用いる抗体により定量値が異なることが予想される」とある。このこ

とから、参加機関から提出された測定値は、試料別、測定キット別に算出したロバスト平均値を付与値として解析を行った。

データ解析は、まず、メジアン±50%の範囲を超える報告値を除外するメジアン・クリーニング (MC) を行った。次にロバスト方式の統計である、エクセル・マクロによるプログラム [作成：システムサポート、大隅昇] によるHuberの proposal 2の推定方式からロバスト平均値およびロバスト標準偏差を算出した。

統計解析には $\bar{X}$ - $R$ 管理図を代用した方法と $z$ -スコアによる方法を用いた。

$\bar{X}$ - $R$ 管理図を代用した方法では、統計解析システムJMP (ver. 11.0.0、SAS Institute Japan) を用いた。また、 $\bar{X}$ - $R$ 管理図の管理限界線の値はこれまでの結果より [ロバスト平均値±ロバスト平均値の30%] とした。

$z$ -スコアはロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いて算出した。

また、アンケート結果をとりまとめ、検討を加えた。

参加31機関中、モリナガ(カゼイン)キットを使用した機関は30機関、日本ハムキットを使用した機関は31機関、プリマハムキットおよびモリナガ(BLG)キットを使用した機関はそれぞれ1機関であった。したがって、プリマハムキット及びモリナガ(BLG)キットは使用機関数が少なかったことからキットごとの統計解析を行わなかった。

(倫理面への配慮)

添加試料が食材であるため、誤って口

に入ることが無いよう、試料の残余や廃棄物は速やかに焼却処分とした。

外部精度管理調査試料については、検査終了後の調査試料の保管期間および廃棄は、各機関のSOPに従って実施することとした。

## C. D. 研究結果および考察

### 1. 外部精度管理調査のパイロットスタディ

#### 1) 外部精度管理調査試料の均質性

均質性試験の結果を表1に示した。モリナガ(カゼイン)キットと日本ハムキットでは測定値が11~12  $\mu\text{g/g}$ と高値、プリマキットとモリナガ(BLG)キットでは約7  $\mu\text{g/g}$ 程度と低値となった。また、同一キットにおける2試料の結果は、ほぼ同等の数値を示した。また、相対標準偏差は試料1で3.2~4.6%、試料2では3.7~3.8%と、すべて5%以下であり、キット間、試料間ともに大きな差は認められなかった。したがって、試料1、2ともに4種キットのいずれにおいても均質と判断した。

また、作製した試料は4種のいずれのキットを用いても評価可能であると結論した。

測定値が高値を示したモリナガ(カゼイン)キットはカゼインを、日本ハムキットではカゼインを含む複合抗原を標的としており、一方、測定値が低値を示したプリマキットとモリナガ(BLG)キットでは標的抗原がともにBLGであり、高値を示したキットと低値を示したキット間の検出感度の差はキットの抗体によるものと考えられた。

## 2) 外部精度管理調査試料の安定性

安定性は、調査期間後(作製後約4か月)に行った(表2)。均質性試験での結果を100%として安定性を算出したところ、試料1および試料2ではそれぞれ96~103%および97~105%の範囲内であり、両試料とも調査期間中、安定であったと判定した。

## 3) 外部精度管理調査結果(回収データの集計結果)

参加機関の報告値を試料別かつ測定キット別に集計した結果を表3に示した。また、データ分布を図1に示した。モリナガ(カゼイン)キットは30機関が、日本ハムキットは31機関が使用した。プリマハムキットおよびモリナガ(BLG)キットを使用した機関はそれぞれ1機関であったことから統計解析を行わず、参考値として扱うこととした。

試料1の平均値はモリナガ(カゼイン)キットにおいて日本ハムキットよりもやや高い値を示したが、試料2では両キットで、ほぼ同じ値を示した。相対標準偏差はモリナガ(カゼイン)キットで7.80~8.23%、日本ハムキットでは4.97~5.70%となり、日本ハムキットで低い値を示した。

プリマハムキットとモリナガ(BLG)キットは、ともに1データであるが、測定値は試料1および試料2ともに7 µg/g台を示し、当センターにおける品質評価試験の結果同様、モリナガ(カゼイン)キットと日本ハムキットに比べ低値を示した。

## 4) キット別集計結果

### (1) モリナガ(カゼイン)キット

モリナガ(カゼイン)キットを用いて測定した30機関のデータにより算出され

た統計量を表4に示した。また、報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図2に、試料1および試料2の結果および評価一覧を表5および表6に記載した。

### a) 試料1の解析結果

モリナガ(カゼイン)キットを用いて測定した30機関において、MCで除外された機関はなかった。30機関のロバスト平均±標準偏差は $12.15 \pm 1.00$  µg/g(相対標準偏差8.23%)であった。 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線外の機関は認められなかったが、 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関は1機関存在した(図3)。

また、 $z$ -スコアの絶対値が3以上の機関は1機関認められたが、 $z$ -スコアの絶対値が2以上、3未満の機関は認められなかった[図5、a)]。

### b) 試料2の解析結果

モリナガ(カゼイン)キットを用いて測定した30機関において、MCで除外された機関はなかった。全機関のロバスト平均値±標準偏差は $11.93 \pm 0.93$  µg/g(相対標準偏差7.80%)であった。 $\bar{X}$ 管理図および $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関はなかった(図4)。

また、 $z$ -スコアの絶対値が3以上の機関は認められなかったが、 $z$ -スコアの絶対値が2以上、3未満の機関は2機関存在した[図5、b)]。

## (2) 日本ハムキット

日本ハムキットを用いて測定した31機関のデータにより算出された統計量を表7に示した。また、報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図6に、試料1および試料2の結果および評価一覧を表8および表9に記載した。

#### a) 試料1の解析結果

日本ハムキットを用いて測定した31機関において、MCで除外された機関はなかった。全機関のロバスト平均値±標準偏差は $11.57 \pm 0.66 \mu\text{g/g}$  (相対標準偏差5.70%)であった。 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線外の機関は認められなかったが、 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関は1機関存在した (図7)。

また、 $z$ -スコアの絶対値が3以上の機関は1機関、 $z$ -スコアの絶対値が2以上、3未満の機関は同じく1機関認められた [図9、a)]。

#### b) 試料2の解析結果

日本ハムキットを用いて測定した31機関において、MCで除外された機関はなかった。全機関のロバスト平均値±標準偏差は $11.66 \pm 0.58 \mu\text{g/g}$  (相対標準偏差4.97%) であった。 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線外の機関は認められなかったが、 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関は1機関存在した (図8)。

また、 $z$ -スコアの絶対値が3以上の機関は1機関 (機関番号25)、 $z$ -スコアの絶対値が2以上、3未満の機関は3機関認められた [図9、b)]。試料2の相対標準偏差は5.0%未満であり、モリナガ (カゼイン) キットの試料2のそれと比較すると2.5%以上低く、また、機関番号25の値は「ロバスト平均 - (ロバスト平均の) 15.9%」であり、通知法の別添「アレルギーを含む食品の検査方法」中、別添4「アレルギーを含む食品の検査方法を評価するガイドライン」の「4. 特定原材料検知法開発者が公表すべき検査方法の性能とその範囲に関する提言」に記載されている試験室

間バリデーションの基準の室間精度25%よりも明らかに低かった。したがって、当該機関は今回提出された参加機関の測定値が揃っていたために、 $z$ -スコアの絶対値が3以上となった可能性も考えられた。

#### (3) プリマハムキット

プリマハムキットを用いて測定した機関は1機関であったため、統計解析は行わず当該機関の報告値、平均値および濃度の範囲についてのみ記載した (表10)。

#### (4) モリナガ (BLG) キット

モリナガ (BLG) キットを用いて測定した機関は1機関であったため、統計解析は行わず当該機関の報告値、平均値および濃度の範囲についてのみ記載した (表11)。

#### (5) キットのロットと測定値について

今回の外部精度管理調査研究において、モリナガ (カゼイン) キットでは8ロット、日本ハムキットでは3ロットとともに複数のロットが使用されていたことから、ロットと報告値の関連について図10に示した。プリマハムキットおよびモリナガ (BLG) キットのデータはそれぞれ1機関、1ロットであった。

モリナガ (カゼイン) キット [図10、a)] において1機関だけが使用したロットは5ロットあった。今回モリナガ (カゼイン) キットを使用した機関で $z$ -スコアで3以上となったのは1機関の1試料だけで、同機関のもう片方の試料は高値を示しているものの、 $z$ -スコアは3未満であり、また、同じロットを使用した他機関の測定値は他のロットと同じような値を示しており、明確なロット差は認められなかった。

日本ハムキット [図10、b)] について

は全3ロット中1ロットが1機関の使用であった。全体の分布からは明確なロット差は認められなかった。

今回、試料1、試料2ともに相対標準偏差がモリナガ（カゼイン）キットで日本ハムキットよりも高い数値を示したが、これは前者では8ロット、後者では3ロットと使用されたロット数に差があったことが影響した可能性も考えられた。

プリマハムキット [図10、c)] およびモリナガ（BLG）キット [図10、d)] についてはそれぞれデータ提出機関が1機関、使用されたロットは1ロットであった。両キットで使用されたロットは当センターの均質性および安定性測定で使用したものと同一であったことから、参考のためにそれぞれの図に当センターの2データを追加した。どちらのキットにおいても、各試料ごとの測定値は3データでほぼ同じであり、同ロット内で安定した結果が得られた。

#### (6) 検量線について

本調査研究ではキットのロットは指定しておらず、参加機関が任意のロットを使用してデータの提出を行っている。前述の通り、本年度はモリナガ（カゼイン）キット（30機関）および日本ハムキット（31機関）では、それぞれ8ロットおよび3ロットが、プリマハムキットおよびモリナガ（BLG）キットでは各1機関、1ロットが使用された。また、全ての機関はキットの使用期限内に試験を実施していた。

モリナガ（カゼイン）キットおよび日本ハムキットの全検量線を図11および図12に示した。両キットで95%信頼区間から外れた検量線がそれぞれ1機関認められた。

また、プリマハムキットおよびモリナガ（BLG）キットの検量線と使用したロットの情報は、それぞれ図13と表12および図14と表13に示した。両キットを使用した機関は各1機関とデータ数が少なかったため、当センターで同じロットを用いた2試験で得られた検量線をそれぞれの検量線とともに示した。他のキットにおけるロットごとの検量線分布と比較し、このロットでは機関差はないと推察された。

モリナガ（カゼイン）キットと日本ハムキットにおいて本パイロットスタディで使用されたロットの情報とロット別の検量線のグラフはそれぞれ表14と図15、および表15と図16に示した。どちらのキットにおいても検量線に明らかなロット差は認められなかった。

個別のデータでは、モリナガ（カゼイン）キットおよび日本ハムキットにおいて各1機関が参加機関全体の検量線から算出した95%信頼区間から外れていた。

モリナガ（カゼイン）キットで95%信頼区間から外れた機関番号20 [図15、a)] は試料1、試料2ともにZスコアの絶対値が2未満と良好な数値を示したが、参加機関中において試料1は下から2番目、試料2では最低のZスコアを示した。機関番号20が使用したモリナガ（カゼイン）キットのロットは当該機関しか使用しておらず、検量線が高めに出るのがこのロットの特性かどうかは確認できなかった。しかしながら、同機関における日本ハムキットの検量線は、ほぼ総平均に等しかった。また、試料1ではZスコアの絶対値が2未満と良好であったものの、参加機関中では下から2番目の数値であった。これら

のことから、検量線が全体の集団から外れたことはデータに大きな影響を及ぼしてはいないと考えられたが、この機関は恒常的に低値を出しやすい傾向にある可能性が考えられた。

日本ハムキットでは機関番号3が95%信頼区間から下方へ外れた検量線を示した[図16、b]。当該機関が使用したロットは20機関が使用していたが、95%信頼区間から外れたのは同機関だけであった。機関番号3は試料1において $z$ -スコアの絶対値が3以上であり、また、試料2では $z$ -スコアの絶対値は2以上3未満ではあるが、参加機関中では最高の $z$ -スコアを示した。一方、同機関はモリナガ（カゼイン）キットの検量線では95%信頼区間内に入り、また、試料1、試料2ともに $z$ -スコアの絶対値は1未満であった。

今回の結果からは、検量線が全体の集団から外れても、必ずしも $z$ -スコアの異常にはつながらなかったが、精度管理を行う上で、背景データとして検量線の線形を蓄積することは意味があると考えられる。背景データから明らかに異なった検量線が得られた場合、データ解釈には注意が必要な場合もあるだろう。

## (7) 測定値の相関性

### a) 同一キットにおける試料間の測定値の相関性

複数機関が使用したモリナガ（カゼイン）キットおよび日本ハムキットにおいて、試料1と試料2間の報告値の相関を図17に示した。その結果、相関係数はモリナガ（カゼイン）キットで0.864、日本ハムキットでは0.783となり、いずれも強い相関が認められた。また、モリナガ

（カゼイン）キット、日本ハムキットともに確率楕円がほぼ $y=x$ 上に伸びていた。これは試料1の報告値と試料2の報告値がほぼ等しかったことを示している。

### b) 同一試料におけるキット間の測定値の相関性

各試料におけるモリナガ（カゼイン）キットと日本ハムキット間の相関を図18に示した。試料1では相関係数が0.470、試料2では0.430とどちらも弱い相関を示した。各点は、比較的まとまってプロットされているが、これは、どの機関でも、どちらのキットにおいても各試料で得られた測定値に大きな差がなく、結果的にデータがグラフ上で集まったためと思われる。

## 5) 回収データの確認

各参加機関からデータを回収後、提出された生データと報告書のデータ確認を行った。本年度は特に問題は認められなかった。

## 6) 検査手法のまとめ

各参加機関が検査に用いた方法を表16および表17に示した。担当者の経験年数は2年以内が半数以上(17/31機関)であり、経験年数の少ない担当者の積極的な外部精度管理調査への参加がうかがわれた。また、複数の担当者により試験を行っている旨の記載が5機関で認められた。

手法では全機関が遠心分離を実施、ろ過は23機関が実施していた。ピペット操作では、抽出液等の希釈操作および、試薬の添加はほとんどの機関(28/31)が手動で行っており、自動操作の3機関は試薬のプレートへの添加も自動で行っていた。プレートの洗浄方法については、手動が

15機関、自動が16機関と、ほぼ同数であった。

検量線の近似曲線については4パラメーターロジスティック（4PL）が推奨されているが、得られた回答では30機関は4PLを用い、1機関は5パラメーターロジスティック（5PL）を使用した。しかしながら、5PLを使用した機関はBioradのMicroplate Manager, Ver. 5.2を用いており、同ソフトウェアを使用する際は5PLの使用が推奨されていることから、問題ないと判断した。

個々のキットの操作方法は、複数機関が使用したモリナガ（カゼイン）キットと日本ハムキットについてまとめた。両キットとも操作方法に大きな違いはなく、抽出から測定までの期間は日本ハムキットにおいて1日保存した機関が多かったが、提出された記録からこれらの機関のほとんどは、抽出を複数キット分、同時に行い、キットごとに日にちをずらして測定を行ったことによる。

操作法全般からはスコアが外れる要因となるような操作は認められなかった。

## 7) 検査実績のまとめ

参考として参加機関における検査実績（2019年度）を表18および表19に示した。

検査項目について、卵、乳、小麦、そば、落花生およびえび、かにをまとめた甲殻類の特定原材料6種中、すべてで実績があったのは9機関であり、全体の1/3となった。

ELISA法では、実施件数は卵で約760件、乳、小麦において700件程度、そば、落花生で500件超、甲殻類では300件程度であった。卵、乳、小麦は加工食品中での使

用頻度が高いことから、残りの3種よりも多くの検査が求められるためと考えられる。

ELISA法による3491試験中、陽性と判定された試験数は62試験（1.8%）、実施された確認試験14試験中、陽性と判定された試験は11試験（78.6%）であった。したがって、ELISA陽性の場合、確認試験においても高確率で陽性となるとの結果を得た。

## 2. 添加用乳タンパク質の検討

乳検出のための試料作製を行うに際し、添加する乳タンパク質の検討を行った。

スキムミルク又は全乳粉を乳タンパク質としてベビーフード鮭又はとうもろこしペーストに添加した試料を用いて、4種類のELISAキットによる測定を行った。

測定は作製後0か月と6か月で行い、安定性についても確認した。結果は図19に示す。

全ての試料において日本ハムキット及びモリナガ（カゼイン）キットでは、プリマキット及びモリナガ（BLG）キットに比べて高めの値が測定された。

ベビーフード鮭を基材とした試料では、スキムミルク、全粉乳どちらの添加タンパク質でも、日本ハムキット及びモリナガ（カゼイン）キットでの含有量は10～12 µg/gであったが、とうもろこしペーストを基材とした試料ではどちらの添加タンパク質でもモリナガ（カゼイン）キットでは10～12 µg/gであったが、日本ハムキットでは8～9 µg/gとよりもやや低い値を示した。

一方、β-ラクトグロブリンを標的とするプリマハム及びモリナガ（BLG）キットでは添加乳タンパク質に関わらず、ベビ

ーフード鮭試料で6.5~7.2 µg/g、とうもろこし試料で5.4~6.3 µg/gと、とうもろこし試料で若干低めの値を示した。

以上の結果から、乳タンパク質に関してはスキムミルクと全粉乳ではキットに対する反応性に違いは認められなかったが、とうもろこしペーストのように基材によっては反応に差が認められた。基材による検出感度の違いは、周知であり、外部精度管理調査用の試料開発に際しては、複数の基材を用いての検討は必須であると考えられる。また、添加用乳タンパク質としてはより品質が安定していると考えられる試薬ベースのスキムミルクを使用することとした。

#### 4. 外部精度管理調査試料の予備検討

外部精度管理調査試料の基材としてこれまでに使用実績があるベビーフード及びこしあんを用い、スキムミルクを乳タンパク質として添加した2試料について6か月間の安定性を経時的に測定した。結果は図20に示す。

ベビーフード、こしあんともに6か月[モリナガ (BLG) キットでは8か月]を通して日本ハムキット及びモリナガ (カゼイン) キットで高値 (ベビーフード試料: 11.0~12.4 µg/g、こしあん試料: 10.6~12.1 µg/g)、プリマキット及びモリナガ (BLG) キットで低値 (ベビーフード試料: 6.5~7.3 µg/g、こしあん試料: 6.3~7.2 µg/g) となった。これは前項のベビーフード鮭試料及びとうもろこしペースト試料と同じ傾向であった。日本ハムキットでは標的抗原はカゼイン、β-ラクトグロブリン、ラクトアルブミン等の複合タンパク質であり、モリナガ (カゼ

イン) キットではカゼインを標的抗体としている。また、プリマキットとモリナガ (BLG) キットではβ-ラクトグロブリンを標的抗原としていることから、明らかな高値及び低値は、キットの特性と考えられた。

安定性については両試料ともすべてのキットで6か月後に89%以上となり、十分に安定していたと考えられる。

#### E. 結論

本年度の外部精度管理調査に関するパイロットスタディは、乳タンパク質を添加した2試料を用いて31機関を対象に実施した。

パイロットスタディに先立ち、添加用乳タンパク質及び試料中の乳タンパク質の安定性について検討した。その結果、スキムミルクを添加用乳タンパク質として、基材にはベビーフードとこしあんを使用し、試料を作製した。

参加機関より回収したデータからメジアン・クリーニング (MC) 後にロバスト統計量の算出した。なお、MCによる除外機関は求められなかった。

得られたロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いて $z$ スコアを算出、また、 $Xbar-R$ 管理図を代用した方法による評価を行った。

解析は各キットおよび試料ごとに行ったところ、 $z$ スコアの絶対値が3以上となった機関が全体でのべ3機関認められた。

また、 $Xbar$ 管理図では管理限界線の範囲を超える機関は認められなかったが、 $R$ 管理図で管理限界線を超えた機関は全体でのべ3機関認められた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

若栗忍, 佐藤夏岐, 渡辺卓穂: アレルギー物質 (小麦タンパク質) を含む特定原材料検査のための技能試験プログラムのパイロットスタディ2, 第116回日本食品衛生学会学術講演会 (Web) 2020

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表1 外部精度管理調査試料の均質性試験における各キットの結果

キット メーカー	含有量 ( $\mu\text{g/g}$ )			
	試料1		試料2	
	平均 $\pm$ SD	相対標準偏差(%)	平均 $\pm$ SD	相対標準偏差(%)
モリナガ (カゼイン)	11.84 $\pm$ 0.54	4.6	11.59 $\pm$ 0.43	3.7
日本ハム	11.17 $\pm$ 0.41	3.7	11.02 $\pm$ 0.41	3.7
プリマハム	7.29 $\pm$ 0.23	3.2	7.59 $\pm$ 0.29	3.8
[参考] モリナガ (BLG)	7.06 $\pm$ 0.25	3.5	6.83 $\pm$ 0.26	3.8

表2 外部精度管理調査研究試料の安定性試験の結果

キット メーカー	試料1		試料2	
	含有量 ( $\mu\text{g/g}$ )	安定性 (%)	含有量 ( $\mu\text{g/g}$ )	安定性 (%)
	平均 $\pm$ SD	平均 $\pm$ SD	平均 $\pm$ SD	平均 $\pm$ SD
モリナガ (カゼイン)	11.45 $\pm$ 0.24	96.7 $\pm$ 2.0	11.25 $\pm$ 0.28	97.1 $\pm$ 2.4
日本ハム	11.43 $\pm$ 0.09	102.4 $\pm$ 0.8	11.52 $\pm$ 0.21	104.6 $\pm$ 1.9
プリマハム	7.16 $\pm$ 0.09	98.2 $\pm$ 1.2	7.40 $\pm$ 0.20	97.6 $\pm$ 2.6
[参考] モリナガ (BLG)	6.99 $\pm$ 0.10	99.1 $\pm$ 1.3	6.89 $\pm$ 0.24	100.9 $\pm$ 3.6

表3 外部精度管理調査研究報告結果のロバスト解析による結果

1) 試料1

	モリナガ (カゼイン)	日本ハム	プリマハム*	[参考] モリナガ (BLG)*
データ数 (有効機関数)	30	31	( 1 )	( 1 )
平均値 (µg/g)	12.15	11.57	( 7.13 )	( 7.70 )
標準偏差 (µg/g)	1.00	0.66	—	—
相対標準偏差 (%)	8.23	5.70	—	—
添加量 (µg/g)	10			

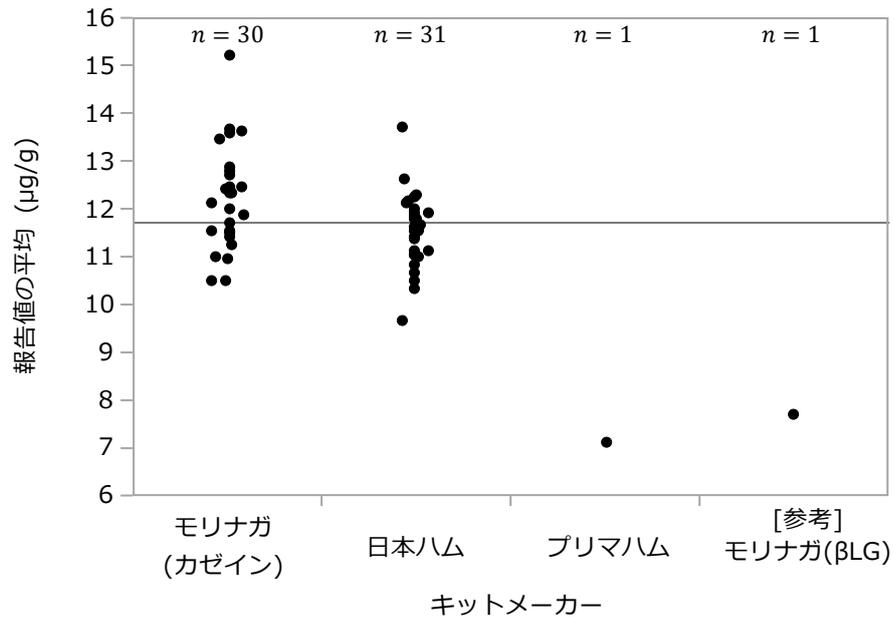
\* プリマハムおよびモリナガ (BLG) キットは1機関のため統計解析は行わなかった。  
数値は参考データ

2) 試料2

	モリナガ (カゼイン)	日本ハム	プリマハム*	[参考] モリナガ (BLG)*
データ数 (有効機関数)	30	31	( 1 )	( 1 )
平均値 (µg/g)	11.93	11.66	( 7.43 )	( 7.92 )
標準偏差 (µg/g)	0.93	0.58	—	—
相対標準偏差 (%)	7.80	4.97	—	—
添加量 (µg/g)	10			

\* プリマハムおよびモリナガ (BLG) キットは1機関のため統計解析は行わなかった。  
数値は参考データ

a) 試料1



b) 試料2

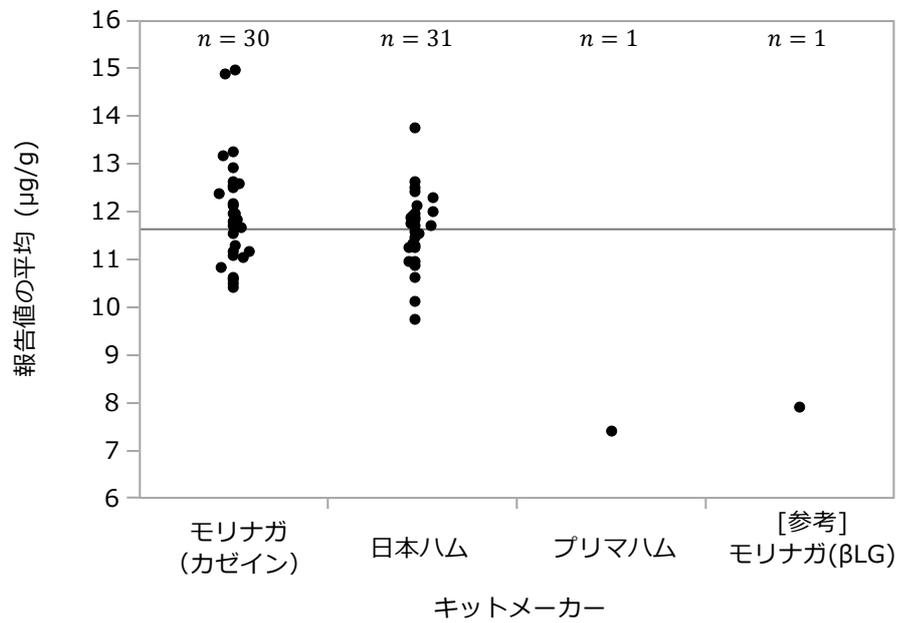


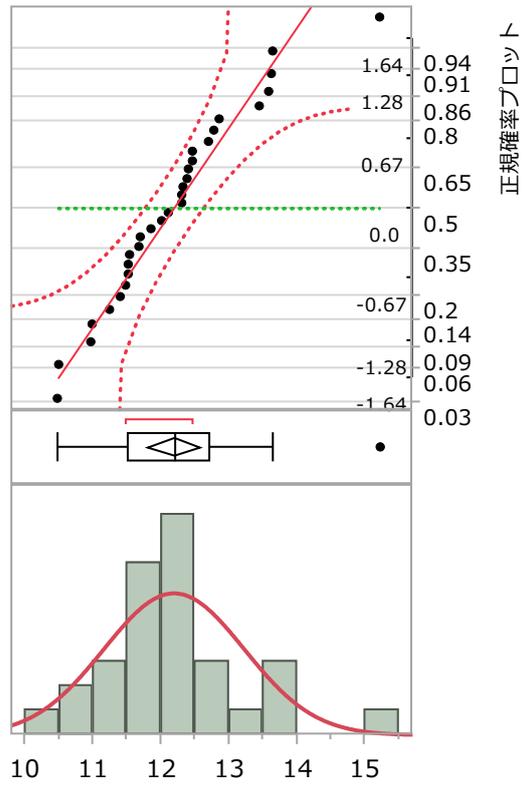
図1 外部精度管理調査研究試料におけるキットごとのデータ分布

表4 モリナガ（カゼイン）キットによる測定結果の統計量一覧

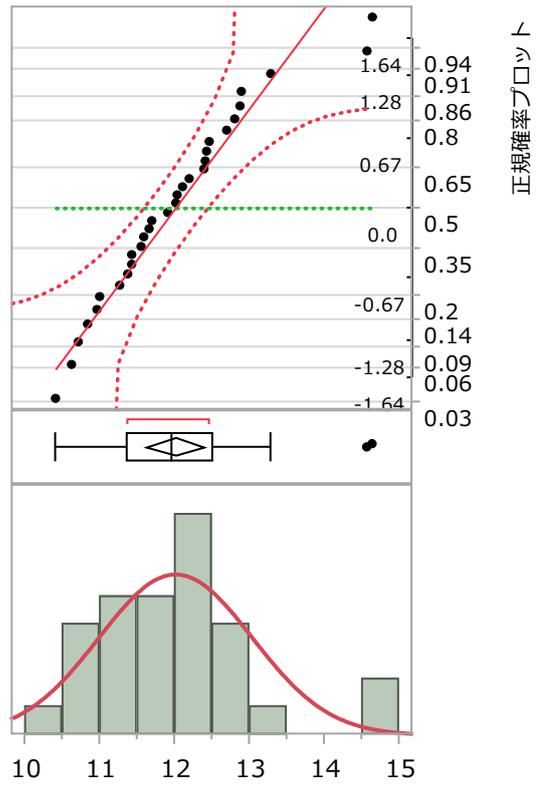
試料名		試料1	試料2
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
MCによる除外機関		0	0
データ（有効機関）数		30	30
測定 の 統計量*	平均値	12.15	11.93
	標準偏差	1.00	0.93
	相対標準偏差	8.23	7.80
	第1四分位数（Q1）	11.515	11.35
	中央値（メジアン）	12.2225	11.965
	第3四分位数（Q3）	12.7275	12.525
	最大値	15.22	14.65
	最小値	10.485	10.405
	範囲	4.735	4.245
	四分位範囲	1.2125	1.175
測定 の 差*	Rの平均	0.45	0.49
	上部管理限界	1.47	1.60

\*：単位は相対標準偏差では%、それ以外では $\mu\text{g/g}$

a) 試料1



b) 試料2



(機関数 30)

図2 モリナガ (カゼイン) キットを用いた測定によるヒストグラムおよび正規確率プロット

表5 モリナガ（カゼイン）キットによる試料1の結果および評価一覧

機関 番号	試料1の報告値		$\bar{X}$ 管理図		$R$ 管理図		$z$ -スコア	
	1	2	$\bar{X}$	評価	$R$	評価	$z$ -スコア	評価
13	10.54	10.43	10.485	満足	0.11	満足	-1.665	満足
20	10.48	10.52	10.500	満足	0.04	満足	-1.650	満足
11	11.23	10.71	10.970	満足	0.52	満足	-1.180	満足
16	11.26	10.75	11.005	満足	0.51	満足	-1.145	満足
21	11.12	11.37	11.245	満足	0.25	満足	-0.905	満足
19	11.27	11.54	11.405	満足	0.27	満足	-0.745	満足
30	12.39	10.61	11.500	満足	1.78	不満足	-0.650	満足
29	11.74	11.30	11.520	満足	0.44	満足	-0.630	満足
28	11.73	11.32	11.525	満足	0.41	満足	-0.625	満足
2	11.75	11.33	11.540	満足	0.42	満足	-0.610	満足
25	11.97	11.42	11.695	満足	0.55	満足	-0.455	満足
24	11.80	11.61	11.705	満足	0.19	満足	-0.445	満足
9	11.81	11.90	11.855	満足	0.09	満足	-0.295	満足
12	12.56	11.48	12.020	満足	1.08	満足	-0.130	満足
6	12.40	11.86	12.130	満足	0.54	満足	-0.020	満足
1	12.43	12.20	12.315	満足	0.23	満足	0.165	満足
23	11.97	12.67	12.320	満足	0.70	満足	0.170	満足
17	12.53	12.14	12.335	満足	0.39	満足	0.185	満足
27	12.11	12.69	12.400	満足	0.58	満足	0.250	満足
4	12.33	12.52	12.425	満足	0.19	満足	0.275	満足
10	12.51	12.42	12.465	満足	0.09	満足	0.315	満足
22	12.82	12.12	12.470	満足	0.70	満足	0.320	満足
8	12.84	12.58	12.710	満足	0.26	満足	0.560	満足
3	12.69	12.87	12.780	満足	0.18	満足	0.630	満足
7	12.58	13.14	12.860	満足	0.56	満足	0.710	満足
5	13.24	13.68	13.460	満足	0.44	満足	1.310	満足
31	13.70	13.48	13.590	満足	0.22	満足	1.440	満足
15	13.39	13.87	13.630	満足	0.48	満足	1.480	満足
18	13.75	13.57	13.660	満足	0.18	満足	1.510	満足
26	14.65	15.79	15.220	満足	1.14	満足	3.070	不満足

評価基準

$\bar{X}$ 管理図 満足： $LCL(8.505) \leq \bar{X} \leq UCL(15.795)$

$R$ 管理図 満足： $0 \leq R \leq UCL(1.47)$

$z$ -スコア 満足： $|z\text{-スコア}| < 3$

不満足： $\bar{X} < LCL$ または $UCL < \bar{X}$

不満足： $UCL < R$

不満足： $3 \leq |z\text{-スコア}|$

表6 モリナガ（カゼイン）キットによる試料2の結果および評価一覧

機関 番号	試料2の報告値		$\bar{X}$ 管理図		$R$ 管理図		$Z$ スコア	
	1	2	$\bar{X}$	評価	$R$	評価	$Z$ スコア	評価
20	10.40	10.41	10.405	満足	0.01	満足	-1.640	満足
25	10.75	10.49	10.620	満足	0.26	満足	-1.409	満足
13	10.84	10.57	10.705	満足	0.27	満足	-1.317	満足
11	10.66	11.03	10.845	満足	0.37	満足	-1.167	満足
29	11.31	10.63	10.970	満足	0.68	満足	-1.032	満足
24	10.91	11.09	11.000	満足	0.18	満足	-1.000	満足
2	11.68	10.84	11.260	満足	0.84	満足	-0.720	満足
21	11.61	11.15	11.380	満足	0.46	満足	-0.591	満足
12	11.67	11.17	11.420	満足	0.50	満足	-0.548	満足
19	11.29	11.56	11.425	満足	0.27	満足	-0.543	満足
16	11.30	11.82	11.560	満足	0.52	満足	-0.398	満足
6	11.51	11.67	11.590	満足	0.16	満足	-0.366	満足
17	11.60	11.71	11.655	満足	0.11	満足	-0.296	満足
30	12.32	11.07	11.695	満足	1.25	満足	-0.253	満足
10	12.02	11.79	11.905	満足	0.23	満足	-0.027	満足
7	12.10	11.95	12.025	満足	0.15	満足	0.102	満足
9	12.13	11.95	12.040	満足	0.18	満足	0.118	満足
28	12.90	11.30	12.100	満足	1.60	満足	0.183	満足
22	12.23	12.16	12.195	満足	0.07	満足	0.285	満足
1	12.15	12.62	12.385	満足	0.47	満足	0.489	満足
4	12.43	12.39	12.410	満足	0.04	満足	0.516	満足
5	12.36	12.50	12.430	満足	0.14	満足	0.538	満足
3	12.80	12.13	12.465	満足	0.67	満足	0.575	満足
23	12.24	13.17	12.705	満足	0.93	満足	0.833	満足
18	12.39	13.23	12.810	満足	0.84	満足	0.946	満足
27	12.83	12.91	12.870	満足	0.08	満足	1.011	満足
31	13.22	12.57	12.895	満足	0.65	満足	1.038	満足
8	14.04	12.55	13.295	満足	1.49	満足	1.468	満足
15	14.20	14.95	14.575	満足	0.75	満足	2.844	満足
26	14.42	14.88	14.650	満足	0.46	満足	2.925	満足

評価基準

$\bar{X}$ 管理図 満足： $LCL(8.351) \leq \bar{X} \leq UCL(15.509)$

$R$ 管理図 満足： $0 \leq R \leq UCL(1.60)$

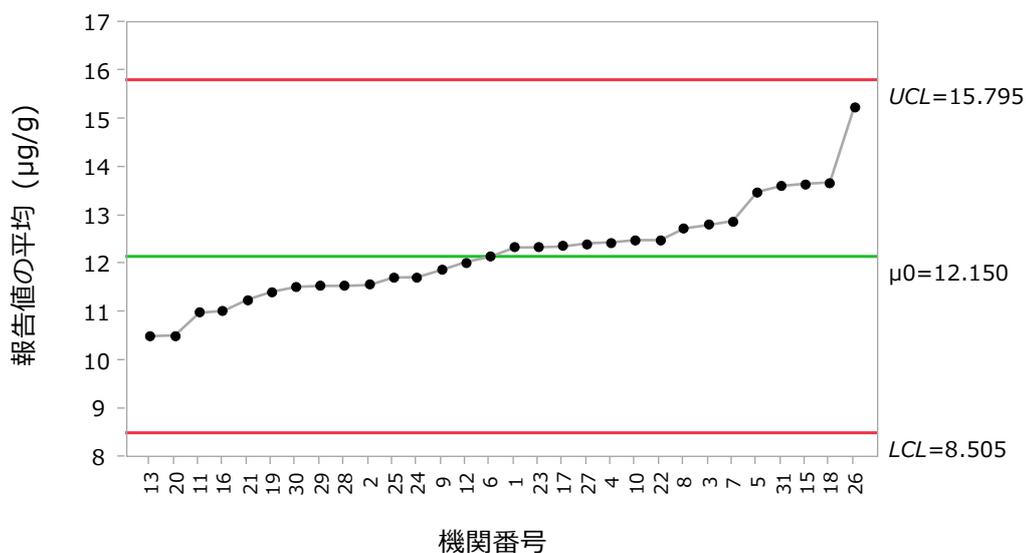
$Z$ スコア 満足： $|\bar{Z}\text{スコア}| < 3$

不満足： $\bar{X} < LCL$ または $UCL < \bar{X}$

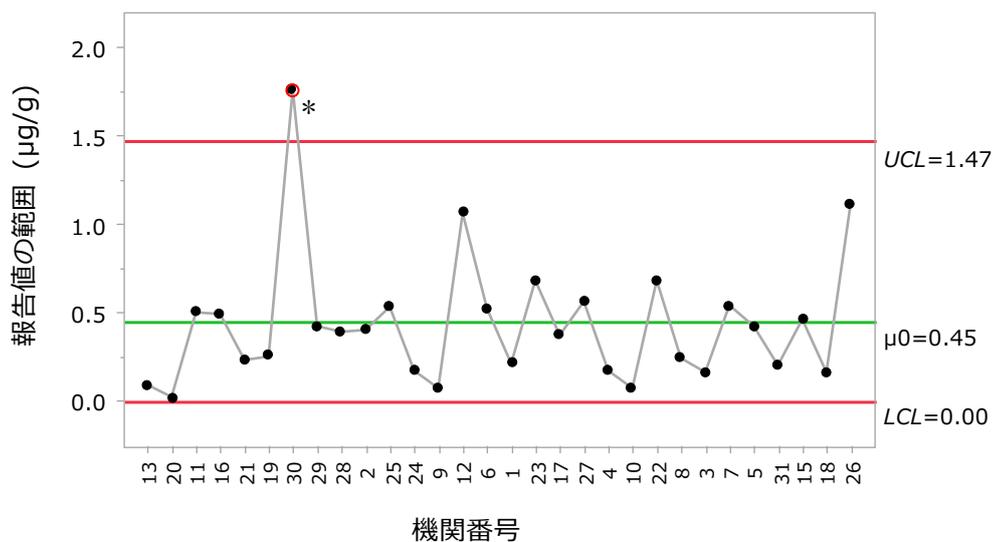
不満足： $UCL < R$

不満足： $3 \leq |\bar{Z}\text{スコア}|$

a)  $\bar{X}$ 管理図



b)  $R$ 管理図

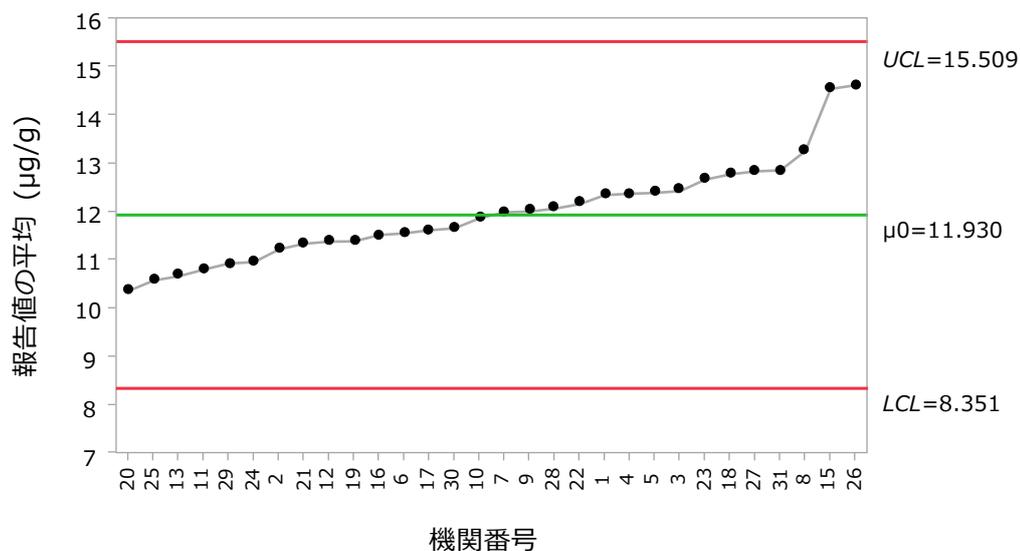


(機関数 30)

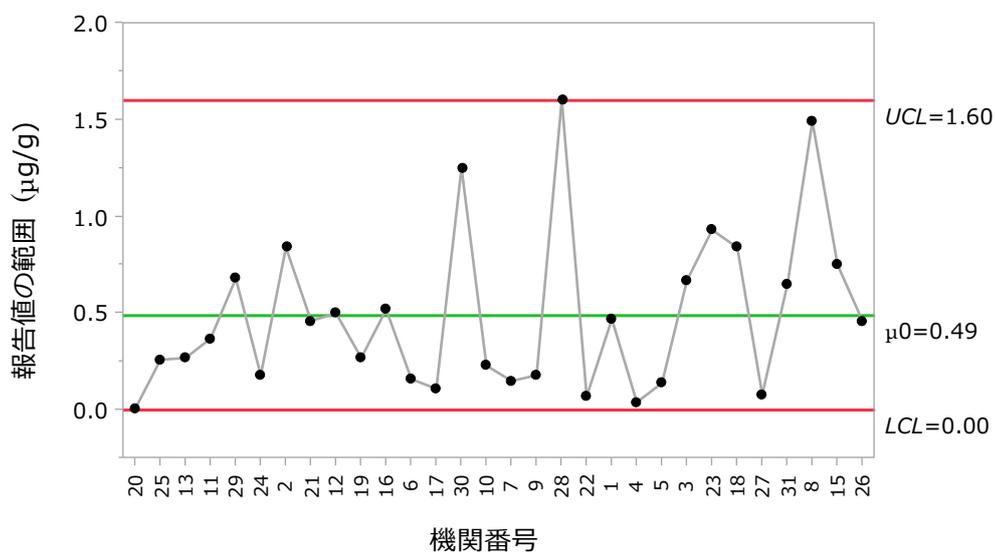
図3 試料1のモリナガ (カゼイン) キットを用いた測定による $\bar{X}$ - $R$ 管理図

$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均 $\pm 30\%$   
 $R$ 管理図 (b) のUCLおよびLCLは $R$ の平均値とJISハンドブックの係数 $D_4 (=3.267)$  から算出

a)  $\bar{X}$ 管理図



b)  $R$ 管理図

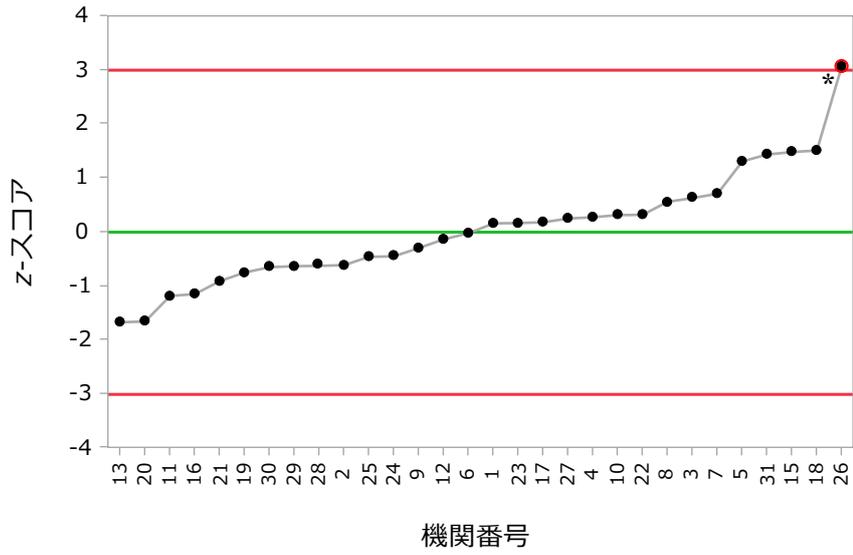


(機関数 30)

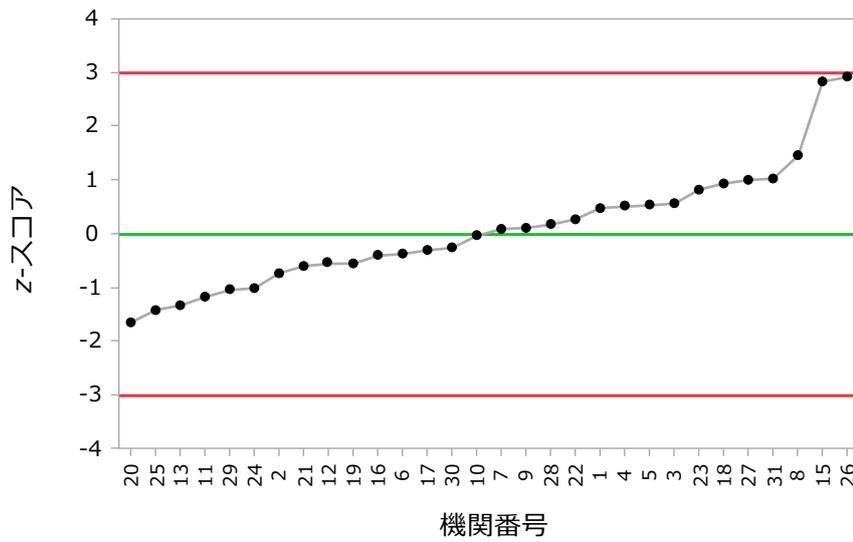
図4 試料2のモリナガ（カゼイン）キットを用いた測定による  $\bar{X}$ - $R$ 管理図

$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均±30%  $R$ 管理図 (b) のUCLおよびLCLは $R$ の平均値とJISハンドブックの係数D4 (=3.267) から算出

a) 試料1



b) 試料2



(機関数 30)

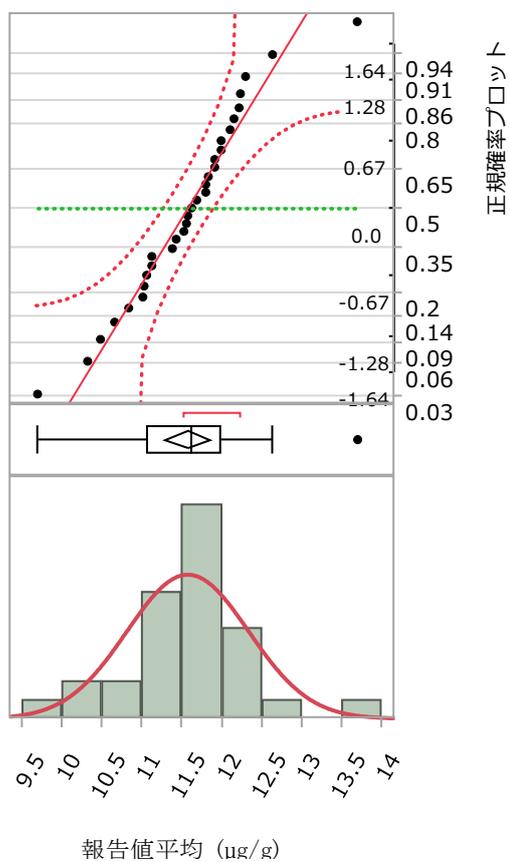
図5 モリナガ (カゼイン) キットを用いた測定によるz-スコア

表7 日本ハムキットによる測定結果の統計量一覧

試料名		試料1	試料2
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
MCによる除外機関		0	0
データ（有効機関）数		31	31
測定 の 統計量*	平均値	11.57	11.66
	標準偏差	0.66	0.58
	相対標準偏差	5.70	4.97
	第1四分位数（Q1）	11.06	11.235
	中央値（メジアン）	11.615	11.675
	第3四分位数（Q3）	11.995	11.98
	最大値	13.7	13.32
	最小値	9.685	9.805
	範囲	4.015	3.515
	四分位範囲	0.935	0.745
測定 の 差*	Rの平均	0.29	0.34
	上部管理限界	0.95	1.11

\*：単位は相対標準偏差では%、それ以外では $\mu\text{g/g}$

a) 試料1



b) 試料2

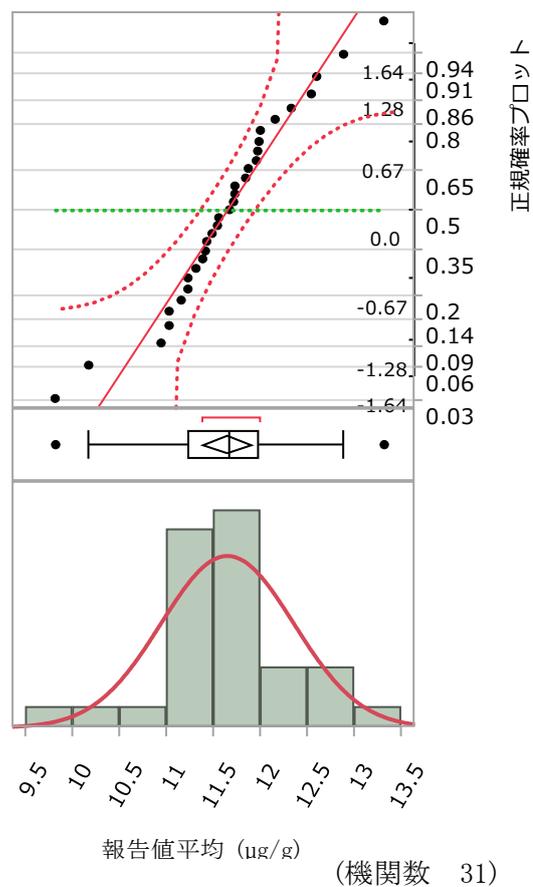


図6 日本ハムキットを用いた測定によるヒストグラムおよび正規確率プロット

表8 日本ハムキットによる試料1の結果および評価一覧

機関 番号	試料1の報告値		$\bar{X}$ 管理図		$R$ 管理図		$z$ -スコア	
	1	2	$\bar{X}$	評価	$R$	評価	$z$ -スコア	評価
14	9.95	9.42	9.685	満足	0.53	満足	-2.856	満足
20	10.04	10.59	10.315	満足	0.55	満足	-1.902	満足
25	10.45	10.52	10.485	満足	0.07	満足	-1.644	満足
23	10.52	10.78	10.650	満足	0.26	満足	-1.394	満足
5	10.95	10.72	10.835	満足	0.23	満足	-1.114	満足
11	11.01	11.00	11.005	満足	0.01	満足	-0.856	満足
19	11.28	10.77	11.025	満足	0.51	満足	-0.826	満足
16	11.18	10.94	11.060	満足	0.24	満足	-0.773	満足
30	10.87	11.38	11.125	満足	0.51	満足	-0.674	満足
13	11.38	10.88	11.130	満足	0.50	満足	-0.667	満足
29	11.37	11.38	11.375	満足	0.01	満足	-0.295	満足
28	11.08	11.78	11.430	満足	0.70	満足	-0.212	満足
10	11.54	11.52	11.530	満足	0.02	満足	-0.061	満足
6	11.68	11.42	11.550	満足	0.26	満足	-0.030	満足
18	11.60	11.55	11.575	満足	0.05	満足	0.008	満足
9	11.62	11.61	11.615	満足	0.01	満足	0.068	満足
24	11.91	11.46	11.685	満足	0.45	満足	0.174	満足
22	11.94	11.65	11.795	満足	0.29	満足	0.341	満足
21	11.89	11.71	11.800	満足	0.18	満足	0.348	満足
31	11.93	11.72	11.825	満足	0.21	満足	0.386	満足
8	11.86	11.95	11.905	満足	0.09	満足	0.508	満足
17	11.84	11.97	11.905	満足	0.13	満足	0.508	満足
2	12.21	11.76	11.985	満足	0.45	満足	0.629	満足
1	12.03	11.96	11.995	満足	0.07	満足	0.644	満足
15	11.64	12.57	12.105	満足	0.93	満足	0.811	満足
12	12.05	12.25	12.150	満足	0.20	満足	0.879	満足
7	12.29	12.16	12.225	満足	0.13	満足	0.992	満足
27	12.30	12.17	12.235	満足	0.13	満足	1.008	満足
26	12.32	12.29	12.305	満足	0.03	満足	1.114	満足
4	12.52	12.74	12.630	満足	0.22	満足	1.606	満足
3	14.18	13.22	13.700	満足	0.96	不満足	3.227	不満足

評価基準

$\bar{X}$ 管理図 満足： $LCL(8.099) \leq \bar{X} \leq UCL(15.041)$

$R$ 管理図 満足： $0 \leq R \leq UCL(0.95)$

$z$ -スコア 満足： $|z\text{-スコア}| < 3$

不満足： $\bar{X} < LCL$ または $UCL < \bar{X}$

不満足： $UCL < R$

不満足： $3 \leq |z\text{-スコア}|$

表9 日本ハムキットによる試料2の結果および評価一覧

機関 番号	試料2の報告値		$\bar{X}$ 管理図		$R$ 管理図		$Z$ -スコア	
	1	2	$\bar{X}$	評価	$R$	評価	$Z$ -スコア	評価
25	9.87	9.74	9.805	満足	0.13	満足	-3.198	不満足
14	10.23	10.12	10.175	満足	0.11	満足	-2.560	満足
24	11.25	10.62	10.935	満足	0.63	満足	-1.250	満足
11	11.18	10.87	11.025	満足	0.31	満足	-1.095	満足
10	11.08	10.97	11.025	満足	0.11	満足	-1.095	満足
28	10.97	11.35	11.160	満足	0.38	満足	-0.862	満足
29	11.51	10.95	11.230	満足	0.56	満足	-0.741	満足
19	11.22	11.25	11.235	満足	0.03	満足	-0.733	満足
23	11.36	11.26	11.310	満足	0.10	満足	-0.603	満足
20	11.31	11.46	11.385	満足	0.15	満足	-0.474	満足
30	10.83	11.99	11.410	満足	1.16	不満足	-0.431	満足
13	11.13	11.72	11.425	満足	0.59	満足	-0.405	満足
17	11.66	11.30	11.480	満足	0.36	満足	-0.310	満足
5	11.40	11.69	11.545	満足	0.29	満足	-0.198	満足
31	11.38	11.74	11.560	満足	0.36	満足	-0.172	満足
26	11.82	11.53	11.675	満足	0.29	満足	0.026	満足
7	11.85	11.57	11.710	満足	0.28	満足	0.086	満足
22	11.62	11.83	11.725	満足	0.21	満足	0.112	満足
2	11.91	11.55	11.730	満足	0.36	満足	0.121	満足
16	11.82	11.88	11.850	満足	0.06	満足	0.328	満足
15	11.91	11.82	11.865	満足	0.09	満足	0.353	満足
21	11.96	11.96	11.960	満足	0.00	満足	0.517	満足
9	12.07	11.87	11.970	満足	0.20	満足	0.534	満足
1	11.85	12.11	11.980	満足	0.26	満足	0.552	満足
6	12.11	11.89	12.000	満足	0.22	満足	0.586	満足
8	12.41	11.90	12.155	満足	0.51	満足	0.853	満足
12	12.26	12.40	12.330	満足	0.14	満足	1.155	満足
18	12.45	12.63	12.540	満足	0.18	満足	1.517	満足
27	12.90	12.29	12.595	満足	0.61	満足	1.612	満足
4	13.29	12.48	12.885	満足	0.81	満足	2.112	満足
3	12.87	13.77	13.320	満足	0.90	満足	2.862	満足

評価基準

$\bar{X}$ 管理図 満足 :  $LCL (8.162) \leq \bar{X} \leq UCL (15.158)$

$R$ 管理図 満足 :  $0 \leq R \leq UCL (1.11)$

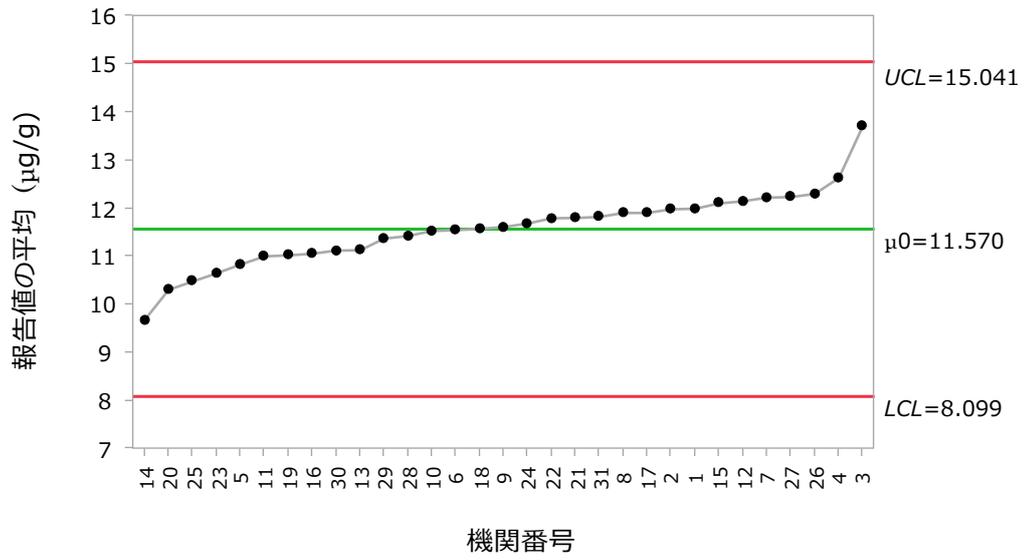
$Z$ -スコア 満足 :  $|Z\text{-スコア}| < 3$

不満足 :  $\bar{X} < LCL$ または $UCL < \bar{X}$

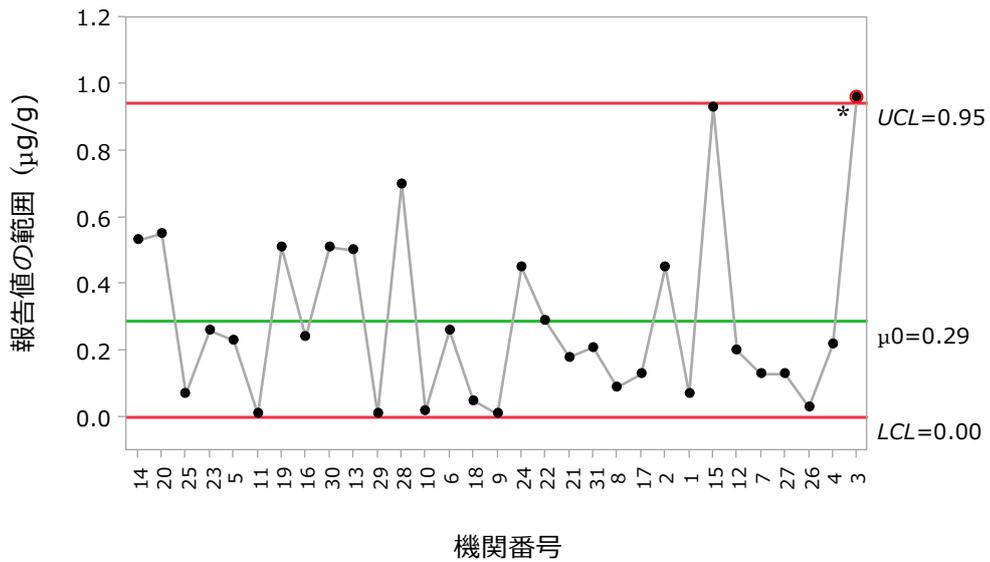
不満足 :  $UCL < R$

不満足 :  $3 \leq |Z\text{-スコア}|$

a)  $\bar{X}$ 管理図



b)  $R$ 管理図

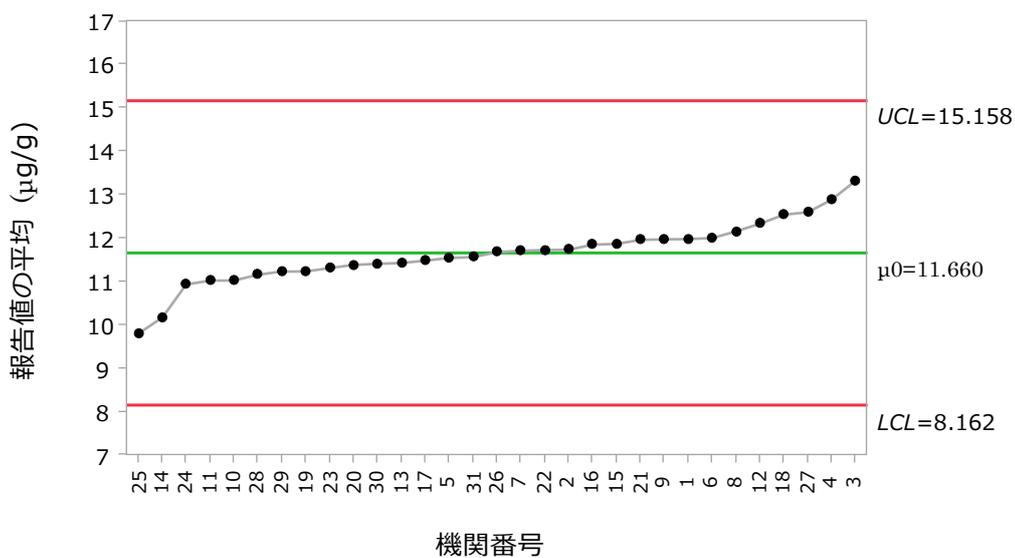


(機関数 31)

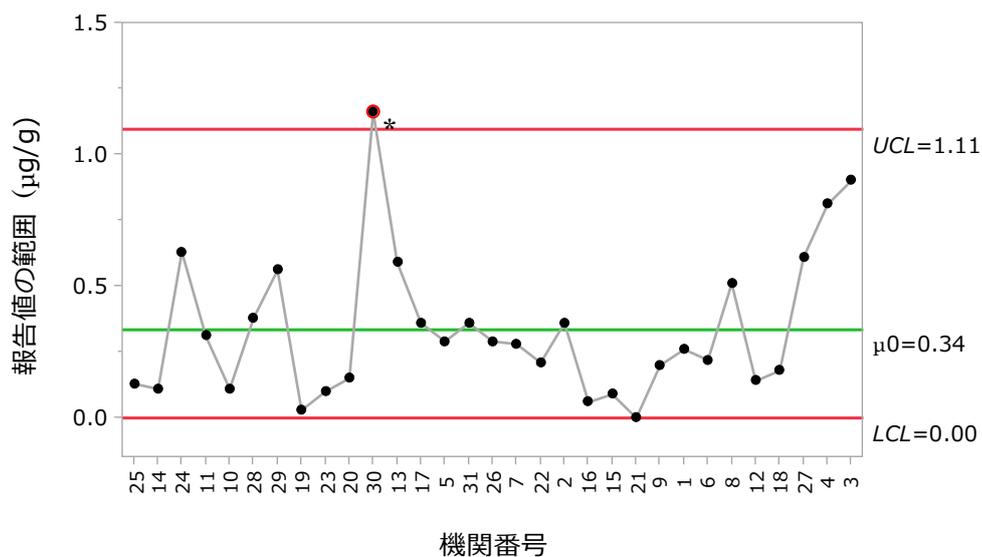
図7 試料1の日本ハムキットを用いた測定による  $\bar{X}$ - $R$ 管理図

$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均±30%  
 $R$ 管理図 (b) のUCLおよびLCLは $R$ の平均値とJISハンドブックの係数 $D_4 (=3.267)$  から算出

a)  $\bar{X}$ 管理図



b)  $R$ 管理図

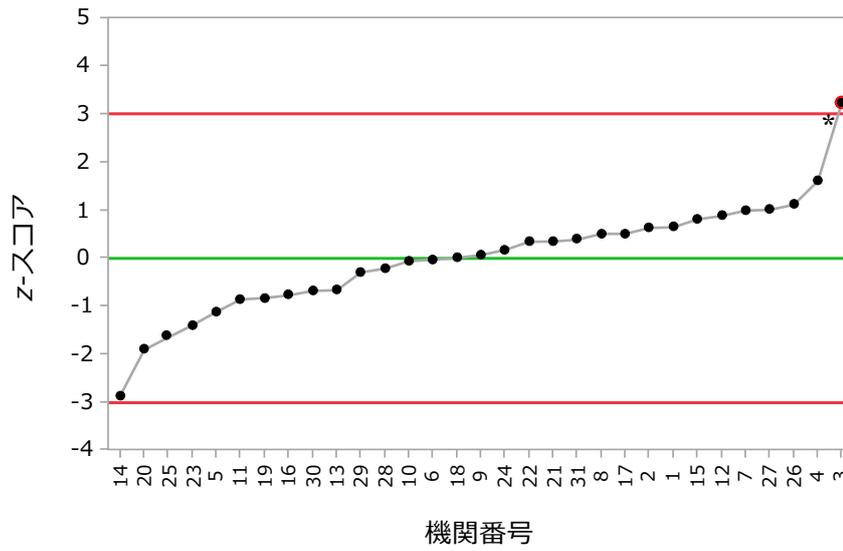


(機関数 31)

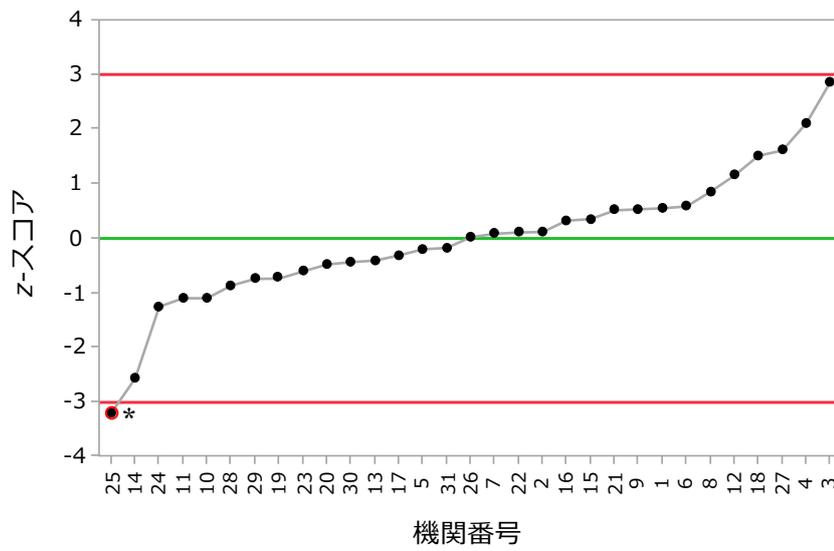
図8 試料2の日本ハムキットを用いた測定による  $\bar{X}$ - $R$ 管理図

$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均 $\pm$ 30%  
 $R$ 管理図 (b) のUCLおよびLCLは $R$ の平均値とJISハンドブックの係数D4 (=3.267) から算出

a) 試料1



b) 試料2



(機関数 31)

図9 日本ハムキットを用いた測定によるzスコア

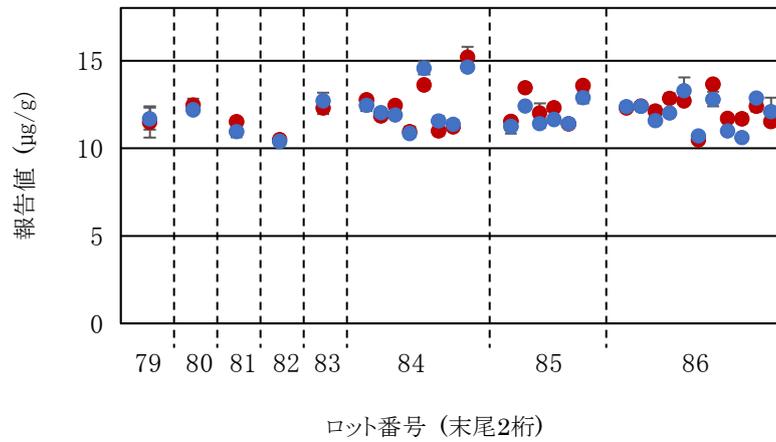
表10 プリマハムキットによる結果一覧

機関番号	試料番号	報告値		$\bar{X}$	$R$
		1	2		
14	試料1	7.22	7.03	7.125	0.19
	試料2	7.44	7.41	7.425	0.03

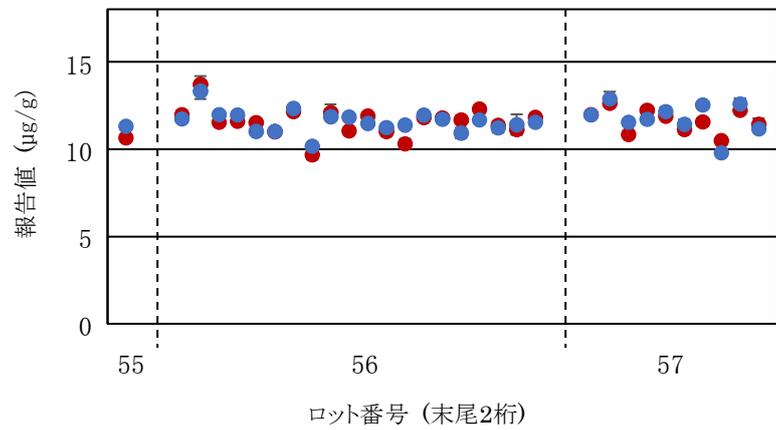
表11 モリナガ (BLG) キットによる結果一覧

機関番号	試料番号	報告値		$\bar{X}$	$R$
		1	2		
A	試料1	7.58	7.82	7.700	0.24
	試料2	7.94	7.90	7.920	0.04

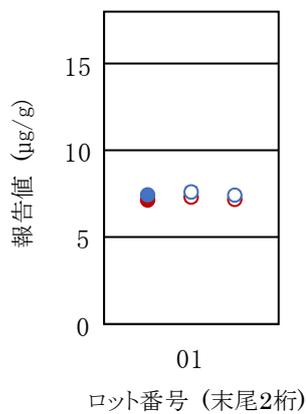
a) モリナガ (カゼイン) キット



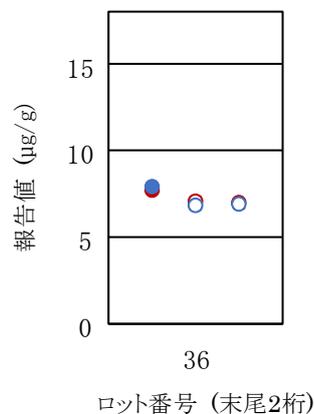
b) 日本ハムキット



c) プリマハムキット



d) モリナガ (BLG) キット



- 試料1
- 試料2
- 食薬センター試料1
- 食薬センター試料2

図10 各キットで得られた報告値のロット間比較

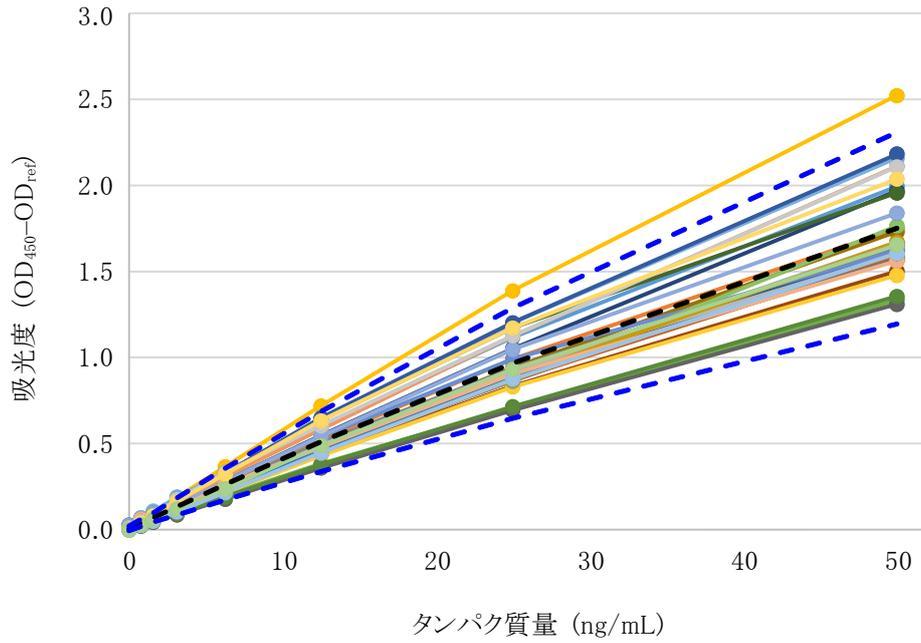


図11 モリナガ（カゼイン）キットを用いた測定における検量線（30機関）  
 ロット別検量線は図16を参照  
 --- 総平均 --- 95%信頼区間

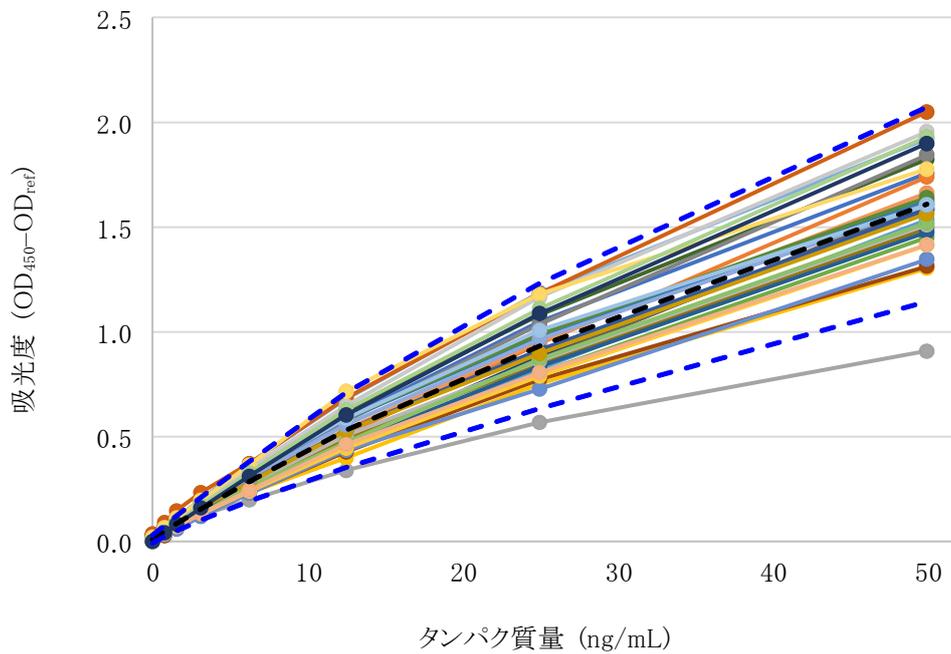


図12 日本ハムキットを用いた測定における検量線（31機関）  
 ロット別検量線は図17を参照  
 --- 総平均 --- 95%信頼区間

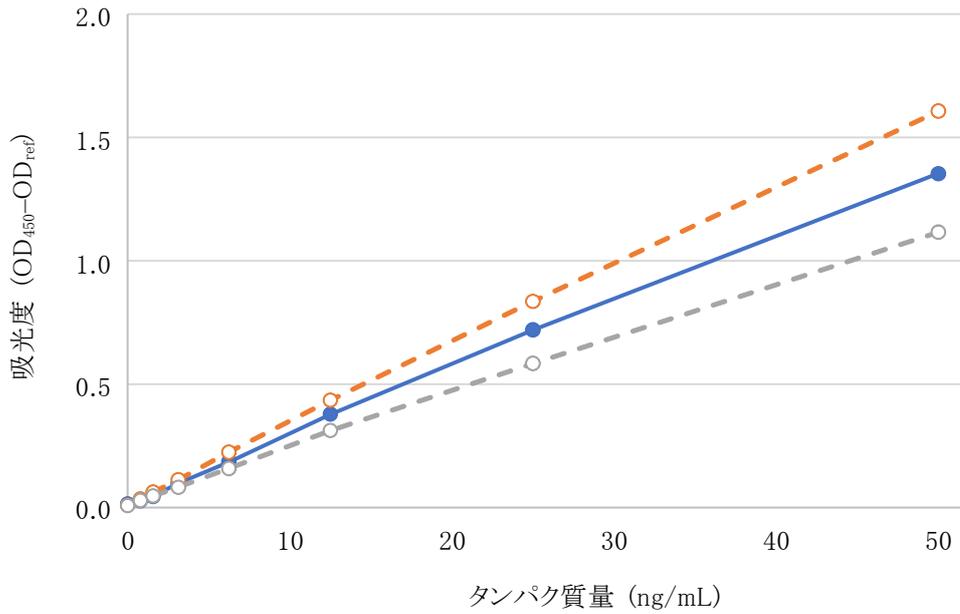


図13 プリマハムキットを用いた測定における検量線  
 (Lot: 2001WHS, 1機関および食薬センター2試験)  
 ● 機関番号14    -○- 食薬センター1    -○- 食薬センター2

表12 外部精度管理調査研究で使用されたプリマハムキットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
2001WHS	2020/11	1

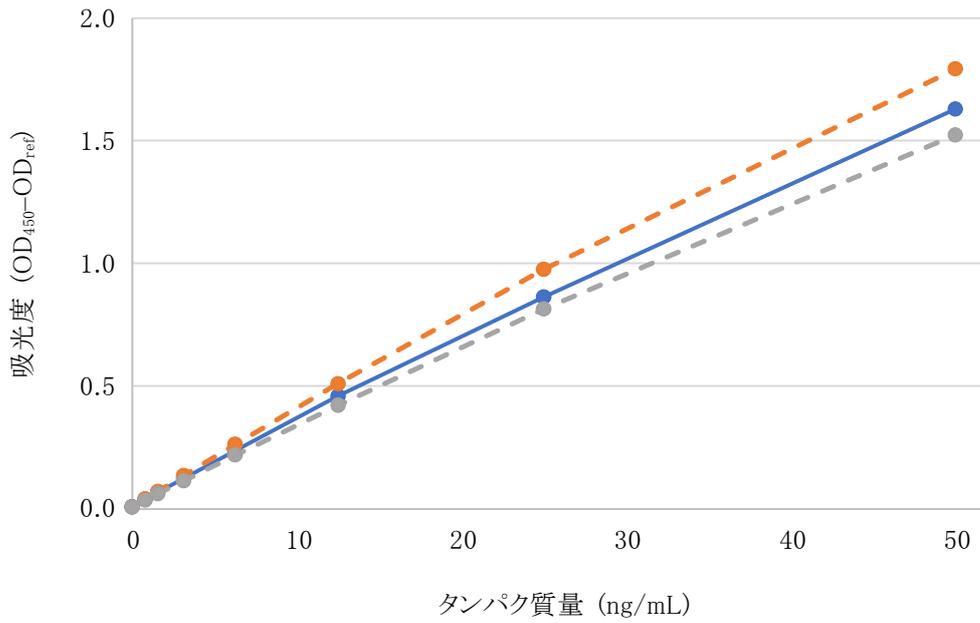


図14 モリナガ (BLG) キットを用いた測定における検量線

(Lot: 20MYSFBL036, 1機関および食薬センター2試験)

—●— 機関番号A    -○- 食薬センター1    -○- 食薬センター2

表13 外部精度管理調査研究で使用されたモリナガ (BLG) キットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
20MYSFBL036	2021/5/7	1

表14 外部精度管理調査研究で使用されたモリナガ（カゼイン）キットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
19NOSFCS079	2020/10/31	1
19DESFCS080	2020/12/2	1
20JASFCS081	2021/1/7	1
20FESFCS082	2021/2/5	1
20MASFCS083	2021/3/4	1
20APSFCS084	2021/4/15	8
20MYSFCS085	2021/5/25	6
20JUSFCS086	2021/6/8	11

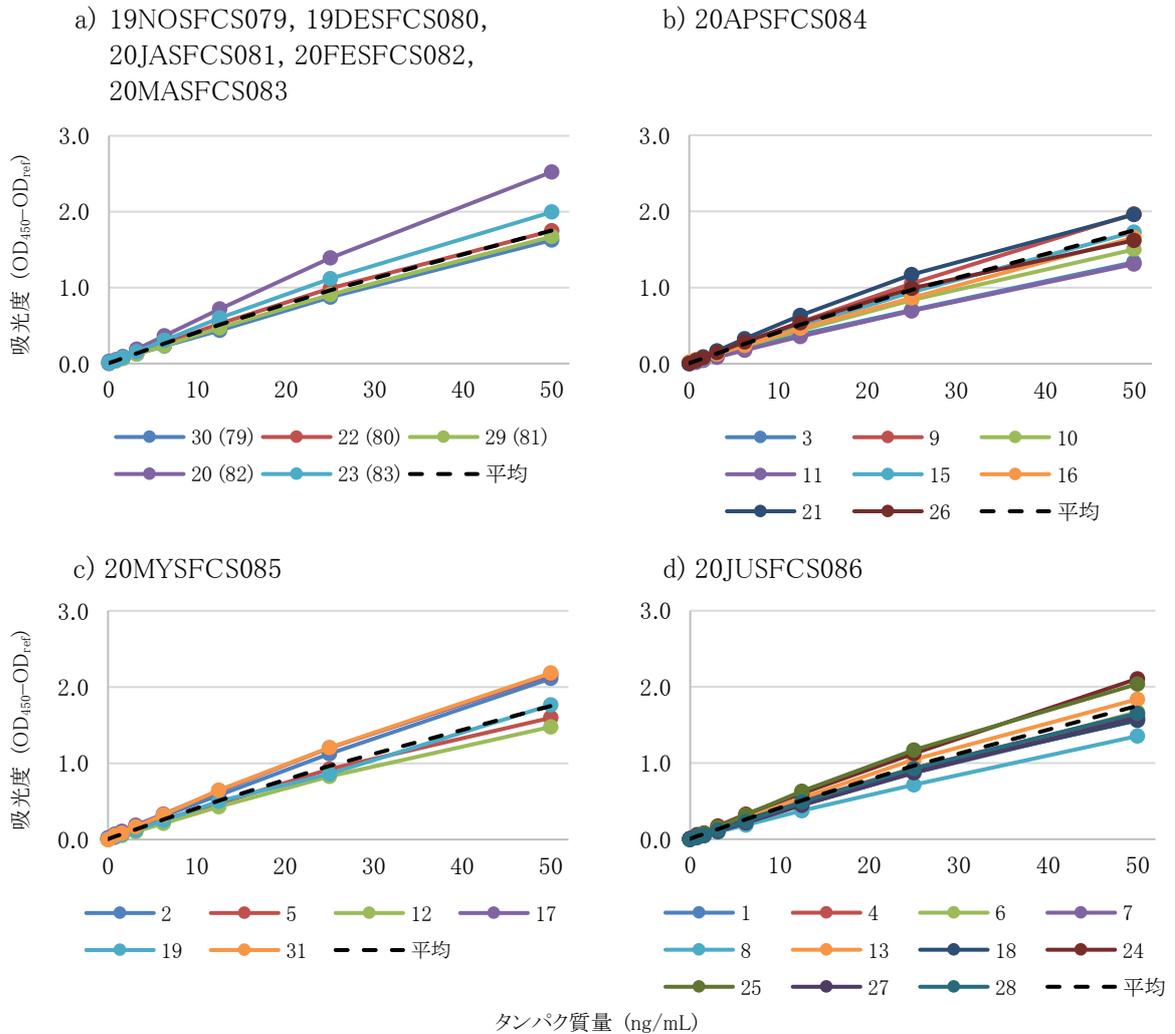


図15 モリナガ（カゼイン）キットを用いた測定におけるロット別検量線

表15 外部精度管理調査研究で使用された日本ハムキットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
FKEM2055	2020/12	1
FKEM2056	2021/2	20
FKEM2057	2021/4	10

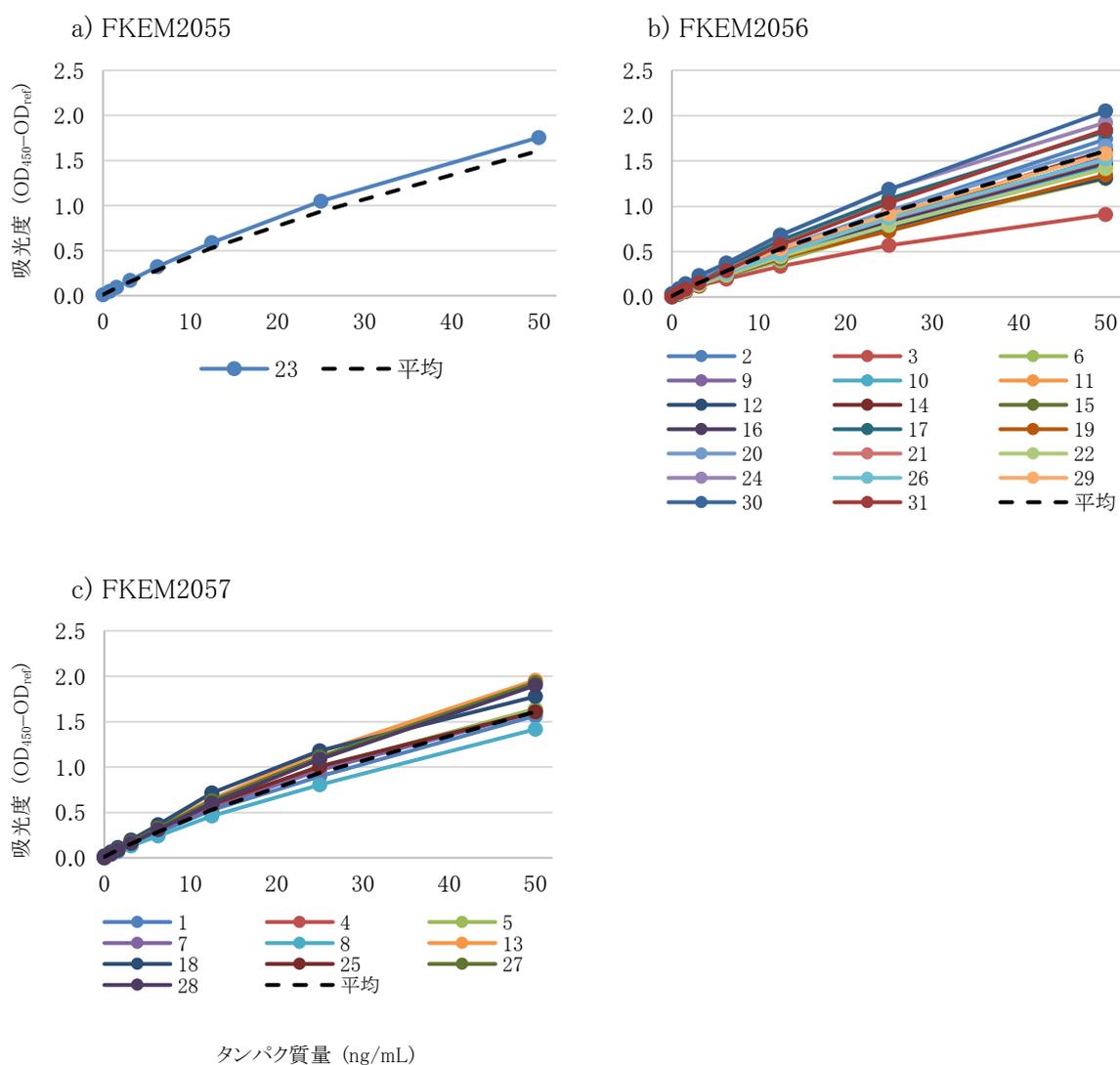
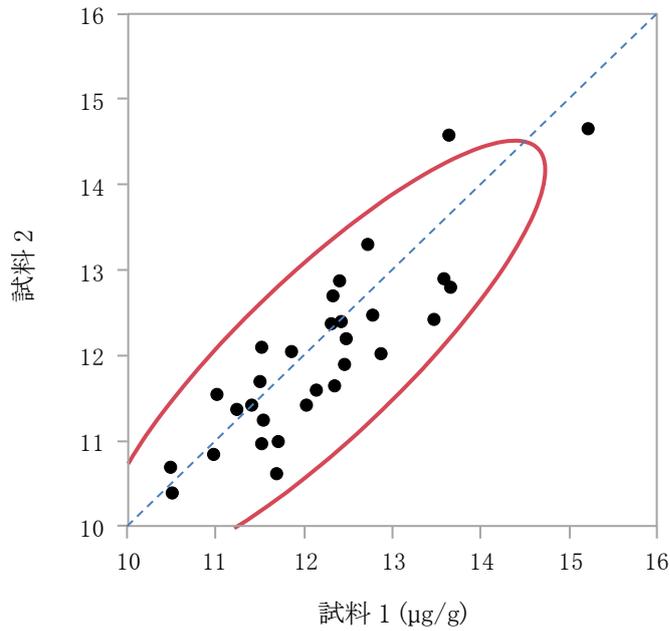


図16 日本ハムキットを用いた測定におけるロット別検量線

a) モリナガ (カゼイン) キット (30機関)



b) 日本ハムキット (31機関)

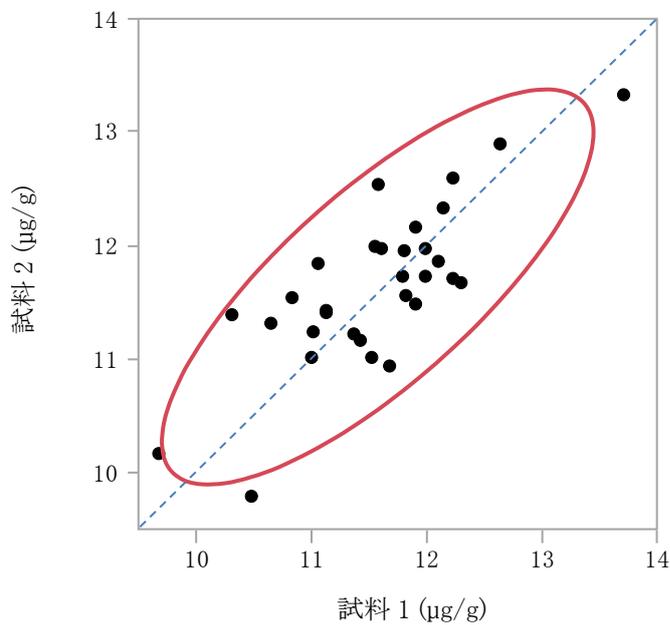
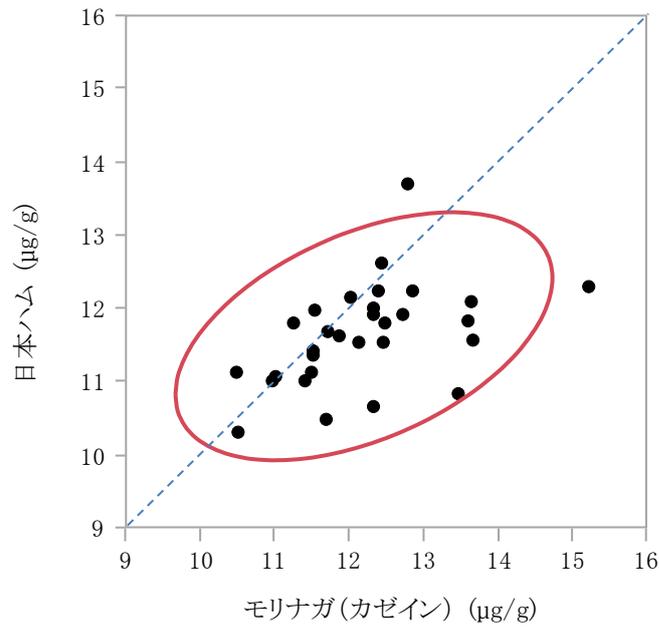


図17 同一キットにおける試料間の相関性

図中の楕円は95%の確率楕円を示す。点線は $y = x$

a) 試料1 (30機関)



b) 試料2 (30機関)

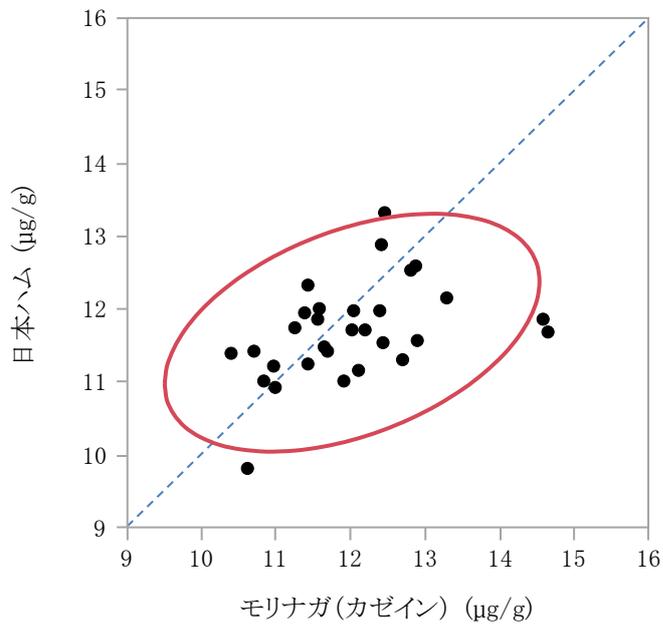


図18 同一試料におけるキット間の相関性

図中の楕円は95%の確率楕円を示す。点線は $y = x$

表16 令和2年度 外部精度管理調査研究における各機関の採用手法（全般）

項目	1	2	3	4	5	6
経験年数 <sup>a</sup>	0	1	2	3 - 5	6 - 10	10超
	6	7	4	8	3	3
抽出方法	振盪	その他				
	31	0				
振盪時間 (h)	12未満	12 - 16未満	16 - 20未満	20以上		
	0	9	18	4		
振盪速度 (rpm)	90未満	90 - 110	110超			
	1	29	1			
ろ過	実施	実施せず				
	23	8				
遠心分離	実施	実施せず				
	31	0				
抽出液等の 希釈操作	手動	自動				
	28	3				
試薬のプレートへの 添加	連続分注					
	マルチch	シングルch	マルチch	自動	その他	
	2	2	21	3	3	
洗浄方法	手動	自動				
	15	16				
マイクロプレート リーダーのメーカー	TECAN	ThermoFisher	Corona	Bio-Rad	その他	
	6	9	5	7	4	
検量線の 回帰法	4PL <sup>b</sup>	5PL <sup>c</sup>				
	30	1 <sup>d</sup>				

(31機関)

- a 担当者複数の場合、長い方の年数  
b 4PL:4パラメーターロジスティック  
c 5PL:5パラメーターロジスティック  
d Microplate Manager, Version 5.2, Bio-Rad

表17 令和2年度 外部精度管理調査研究における各機関の操作手法（キット別）

a) モリナガ（カゼイン）キット（30機関）、使用ロット数 8ロット

項目	1	2	3	4	5
抽出液の 保存期間（日）	0	1	2	3-7	>7
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍		
試料添加時間 （分）	10以内	10-20以内	20-30以内	30超	
操作中の室温 （範囲）	20°C未満	20-30°C	30°C超		
	24	2	2	1	1
	2	3	1		
	24	4	2	0	
	0	30	0		

b) 日本ハムキット（31機関）、使用ロット数 3ロット

項目	1	2	3	4	5
抽出液の 保存期間（日）	0	1	2	3-7	>7
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍		
試料添加時間 （分）	10以内	10-20以内	20-30以内	30超	
操作中の室温 （範囲）	20°C未満	20-25°C	25°Cを挟む上下	25-30°C	30°C超
	20	9	1	0	1
	3	6	2		
	24	4	2	1	
	0	22	5	4	0

表18 2019年度の特定原材料6種（卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類）の検査実績  
種類数

	特定原材料6種中の実施種類数						
	0	1	2	3	4	5	6
実施機関数	4	0	1	6	3	4	9

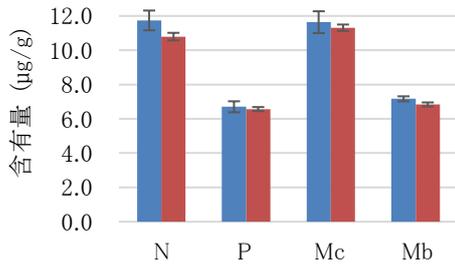
(回答27機関)

表19 2019年度の参加機関の検査実績および使用キット

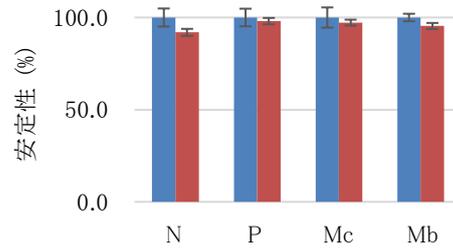
試験区分		特定原材料					
		卵	乳	小麦	そば	落花生	甲殻類
ELISA	実施機関 (27機関)	21	22	21	15	15	12
	総試験数	762	703	702	522	508	294
		(21.8%)	(20.1%)	(20.1%)	(15.0%)	(14.6%)	(8.4%)
	陽性検出機関 (27機関)	4	4	8	3	2	3
	検出試験数	13	11	17	8	3	10
	使用キット [複数回答] (30機関)						
	日本ハム	23	23	24	17	17	—
	モリナガ	24	26	25	18	18	—
	プリマハム	0	0	1	0	1	—
	ニッスイ	—	—	—	—	—	14
	マルハ	—	—	—	—	—	13
確認試験	実施機関 (27機関)	1	1	5	1	1	1
	総試験数	1	1	6	1	1	4
	陽性検出機関 (27機関)	1	1	4	1	0	1
	検出試験数	1	1	4	1	0	4

a) ベビーフード鮭+スキムミルク

i) 含有量

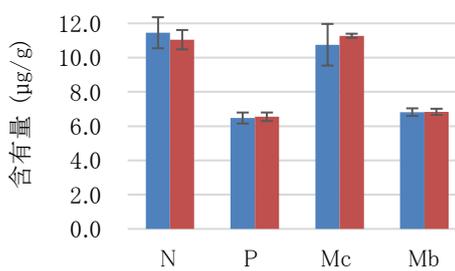


ii) 安定性

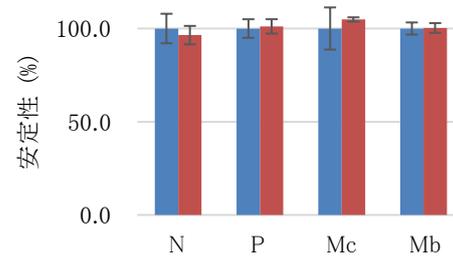


b) ベビーフード鮭+全粉乳

i) 含有量

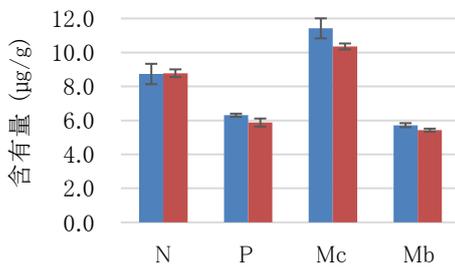


ii) 安定性

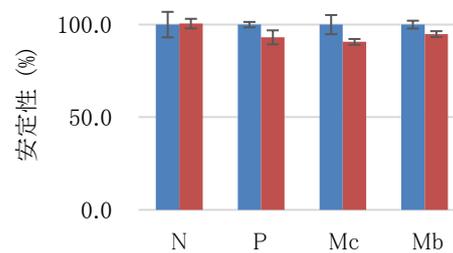


c) ともろこしペースト+スキムミルク

i) 含有量

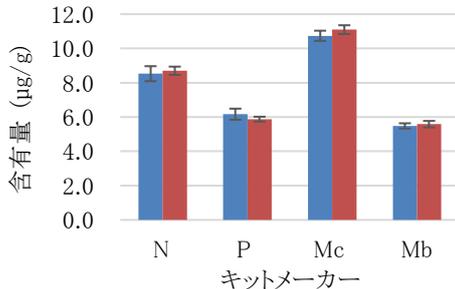


ii) 安定性



d) ともろこしペースト+全粉乳

i) 含有量



ii) 安定性

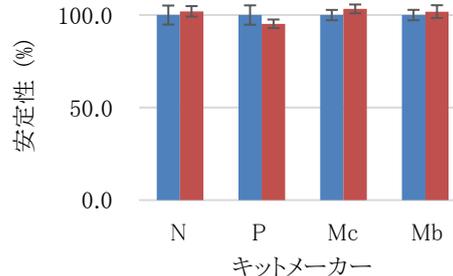


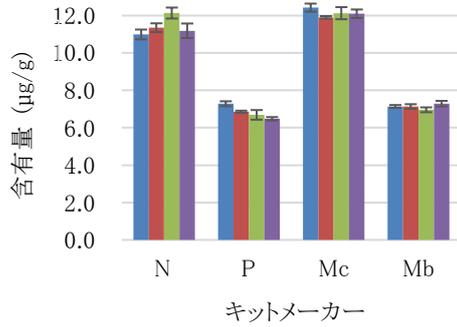
図19 添加用乳タンパク質検討4試料の6か月安定性

■ 0か月 ■ 6か月

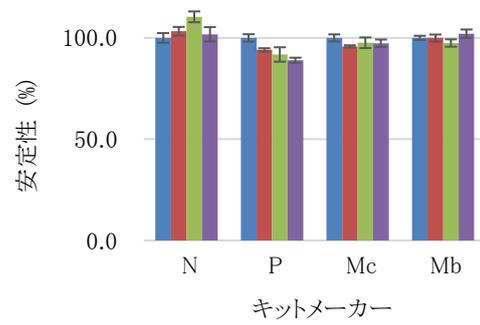
N : 日本ハム, P : プリマハム, Mc : モリナガ (カゼイン), Mb : モリナガ (BLG)

a) ベビーフード+スキムミルク

i) 含有量

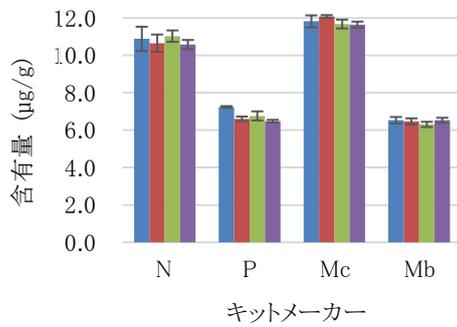


ii) 安定性



b) こしあん+スキムミルク

i) 含有量



ii) 安定性

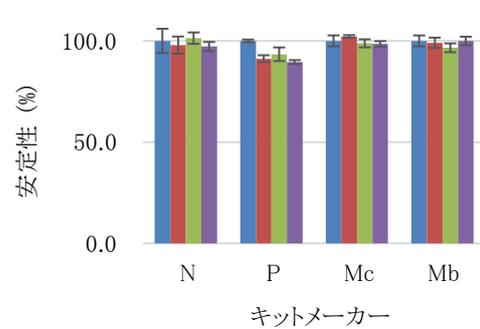


図20 外部精度管理調査予備検討用試料の含量及び安定性の経時的変化

■ 0か月 ■ 1か月 ■ 3か月 ■ 6か月 (Mbは8か月)

N: 日本ハム, P: プリマハム, Mc: モリナガ(カゼイン), Mb: モリナガ(BLG)

## 補足資料

### 令和2年度 特定原材料検査外部精度管理調査研究参加機関

青森県環境保健センター  
宮城県保健環境センター  
千葉県衛生研究所  
東京都健康安全研究センター  
川崎市健康安全研究所  
新潟市衛生環境研究所  
石川県保健環境センター  
長野県環境保全研究所  
長野市保健所 環境衛生試験所  
地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所  
愛知県衛生研究所  
豊田市衛生試験所  
岐阜県保健環境研究所  
滋賀県衛生科学センター  
京都市衛生環境研究所  
神戸市環境保健研究所  
三重県保健環境研究所  
福岡市環境局保健環境研究所  
佐賀県衛生薬業センター  
宮崎県衛生環境研究所  
公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所  
一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC  
一般財団法人 広島県環境保健協会  
コープデリ生活協同組合連合会  
株式会社関西環境センター  
株式会社 生活品質科学研究所 中央研究所  
株式会社 生活品質科学研究所 関西総合検査センター  
株式会社三遠食品分析センター  
オリエンタル酵母工業株式会社  
キューピー株式会社  
森永乳業株式会社

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究

－微生物調査試料添加菌濃度の低減に関する検討(4)－

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 部長
研究分担者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 部長
研究協力者	高坂 典子	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 室長
	梶原 三智香	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	中阪 聡亮	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	堀田 実和	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

#### 研究要旨

食品衛生外部精度管理調査、微生物学調査では、これまで運用してきたE. coli検査、腸内細菌科菌群検査、サルモネラ属菌検査および大腸菌群検査の4項目の調査試料における再開発を行った。

外部精度管理事業の品質向上を目指すため、添加する微生物の濃度を「食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号、以下「公定法」という）に記載された成分規格に近い濃度まで低減した調査試料の開発を実施した。

調査試料に求める条件は、①公定法の試験操作で陽性・陰性の判定が可能であること、②実際の食品検査に近いマトリクスの基材で冷蔵保存が可能であること、③冷蔵保存で微生物の添加から14日以上安定性が認められること（添加直後と添加14日後の差が対数値で±1.0ポイント以内）、④冷蔵から22.5℃（常温）に移管後も生菌数が測定可能であること（輸送時の温度上昇で急激に菌数が低下しない）、の4条件とした。

E. coli検査、腸内細菌科菌群検査、サルモネラ属菌検査の調査試料開発では、調査試料作製手順および採用微生物はそのままに、添加菌液の濃度を従来の1/100にした（n=1）。調査試料は約1か月間の生菌数の挙動と、添加直後および約1か月後の定性試験（公定法）の確認を実施した。この結果、全ての調査試料で全ての条件をクリアし、調査試料としての妥当性が認められた。

大腸菌群検査の調査試料開発では、調査試料作製手順はそのままに、微生物は従来の2菌種および新規4菌種を加え、添加菌液の濃度を従来の1/100にした（n=3）。調査試料は約1か月間の生菌数の挙動と、添加直後および約1か月後の定性試験（公定法）の確認を実施した。この結果、1菌種を除いた5菌種を添加した調査試料で全ての条件をクリアし、調査試料としての妥当性が認められた。

## A. 研究目的

食品衛生管理の外部精度管理事業において、現在当財団で実施している微生物学区分の調査項目では、各検査項目の食品成分規格を大きく超過する生菌数の調査試料を作製している。

これは国内各地へ冷蔵輸送する過程で微生物が死滅することを避けるためであるが、一方で技能試験の調査試料として最適とは言えず、将来的に本来の成分規格に近い濃度の調査試料を提供することが求められる。

本研究では、添加する微生物の濃度を従来の1/100程度に抑え、従来の作製手順を踏襲した調査試料を作製し、この調査試料の生菌数の挙動および定性試験（公定法）を実施することで技能試験の品質への影響を検証することを目的とした。

## B. 方法

### 1. 試料基材および添加菌

#### 1) E. coli検査

試料基材はハンバーグ（市販品）、添加菌は*Escherichia coli* HIC 190367（陽性）、*Acinetobacter calcoaceticus* HIC 190366（陰性）を用いた。

#### 2) 腸内細菌科菌群検査

試料基材はハンバーグ（市販品）、添加菌は*Escherichia coli* HIC 190367（陽性）、*Pseudomonas aeruginosa* HIC 190371（陰性）を用いた。

#### 3) サルモネラ属菌検査

試料基材は液卵、添加菌は*Salmonella* sp. HIC 190364（陽性）、

*Proteus mirabilis* HIC 190368（陰性）を用いた。

#### 4) 大腸菌群検査

試料基材はハンバーグ（市販品）、添加菌は*Klebsiella oxytoca* HIC 190365（陽性）、*Acinetobacter calcoaceticus* HIC 190366（陰性）、*Citrobacter freundii* HIC 190378（陽性）、*Enterobacter cloacae* HIC 190379（陽性）、*Aeromonas hydrophila* HIC 190377（陰性）、*Enterococcus faecalis* HIC 190381（陰性）の6菌種を用いた。

#### 5) 培地等

##### 5-1) E. coli検査

- ・EC培地（日本製薬、日水製薬）
- ・EMB培地（日水製薬）
- ・乳糖ブイヨン培地（日水製薬）
- ・グラム染色液（日水製薬）

##### 5-2) 腸内細菌科菌群検査

- ・EEブイヨン（OXOID）
- ・OF基礎培地（栄研化学）
- ・チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙（日水製薬）

##### 5-3) サルモネラ属菌検査

- ・ラパポートバシリアジス培地（日本製薬、OXOID）
- ・テトラチオネート培地（日水製薬）
- ・DHL寒天培地（日水製薬）
- ・XLDカンテン培地（日本製薬）
- ・MLCB寒天培地（日水製薬）
- ・ブリリアントグリーン寒天培地

(栄研化学)

- CHROMagar Salmonella (CHROMagar)
- ESサルモネラ寒天培地II (栄研化学)
- chromID Salmonella agar (バイオメリュウ)

#### 5-4) 大腸菌群

- BGLB培地 (日水製薬)
- EMB培地 (日水製薬)
- 乳糖ブイヨン培地 (日水製薬)
- グラム染色液 (日水製薬)

#### 5-5) 共通試薬等

- 精製水 (日本薬局方) (小堺製薬)
- 緩衝ペプトン水 (BPW) (ISO組成) (日水製薬)
- 標準寒天培地 (日水製薬)
- SCD培地 (日本製薬)
- その他、培地指定の添加剤等

## 2. 使用機器

調査試料、培地等の滅菌にはオートクレーブを使用した。試験操作は安全キャビネットまたはクリーンベンチ内で行い、培養には恒温槽または恒温水槽を使用した。

## 3. 調査試料の作製

### 1) 基材の滅菌

#### 1-1) ハンバーグ基材

ハンバーグを沸騰水で15分間煮沸して油脂を除去した。新たな沸騰水で再度同様に煮沸後、滅菌用の容器に挿入し、121°Cで75分間の高圧蒸気滅菌を

行った。

#### 1-2) 液卵基材

NaCl : 38.25 g、Tween80 : 45.0 g、精製水 : 3150 mL、グリセリン : 450 gを十分に混和した後、高圧蒸気滅菌可能な樹脂製容器に80 mLずつ分注し、121°Cで30分間の高圧蒸気滅菌を行った。添加菌の添加当日に液卵20 mLを添加したものを液卵基材とした。

### 2) 添加菌の培養

添加菌は標準寒天培地で35.0°C、18-24時間培養し、SCD培地に1白金耳移植後35.0°C、18-24時間培養した。

### 3) 調査試料の作製

#### 3-1) ハンバーグ基材

培養液1 mLをSCD培地99 mLに添加し、十分に混和して希釈培養液を作製した。希釈培養液全量をグリセリン加生食 (グリセリン : 100 g、NaCl : 9.0 g、精製水 : 800 mL) に添加し、十分に混和したものを添加菌液とした。添加菌液にハンバーグを浸漬し、滅菌済容器に挿入した。これを調査試料とした。

試験項目ごとに各菌6個作製し、大腸菌群検査用調査試料は異なる培養液で3セット (各菌6個×3セット) 作製した。

#### 3-2) 液卵基材

培養液1 mLを生理食塩液99 mLに添加し、十分に混和して希釈培養液を作製した。希釈培養液10 mLを生理食塩

液90 mLに添加し、十分に混和したものを添加菌液とした。添加菌液1 mLを液卵基材に添加し、十分に混和したものを調査試料とした。

#### 4) 調査試料の保管条件

調査試料の保管条件は①冷蔵保管（以下、「冷蔵試料」という）、②冷蔵保管10日後に22.5℃に移管（以下、「常温試料」という）の2条件とした（表1）。

#### 4. 調査試料の品質評価

##### 1) 試験溶液の作製

各調査試料は25 g秤量し、225 mLの緩衝ペプトン水（BPW）を添加後にストマッカーで1分間処理した懸濁液を試験溶液とした。

##### 2) 生菌数測定

冷蔵試料は添加直後、10、14（または15）および28（または29）日後の4回、生菌数測定を実施した。

また常温試料は添加14（または15）および28（または29）日後の2回、生菌数測定を実施した。

試験溶液1 mLをBPW 9 mLで段階希釈し、各希釈液1 mLを標準寒天培地で混積平板培地にした（n=2）。これを35.0℃、18時間以上培養し、発育集落を計測して生菌数を算出した。

##### 3) 定性試験

冷蔵試料は添加直後および28（または29）日後の2回、常温試料は28（または29）日後の1回実施した。

各試験操作は後述のとおり実施した。

#### 3-1) E. coli検査、サルモネラ属菌検査、大腸菌検査

試験操作は「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」（平成27年7月29日、食安発0729第4号）に従った（図1から3）。

#### 3-2) 腸内細菌科菌群

試験操作は「生食用食肉の腸内細菌科菌群の試験法について」（平成23年9月26日、食安発0926第1号）に従った（図4）。

### C. D. 研究結果および考察

#### 1. E. coli 検査

##### 1) 生菌数の挙動

E. coli検査調査試料の生菌数の挙動は図5および表2に示したとおりであった。

*E. coli*（陽性）、*A. calcoaceticus*（陰性）ともに冷蔵試料では添加直後から15日後以降の長期間において対数値1.0ポイント以内の減少傾向を示したことから、非常に安定な調査試料であることが示された。また常温試料では陽性、陰性試料ともに添加15日後の生菌数測定が可能であったことから、輸送時の温度上昇が起きても急激な菌数低下を認めない試料であることが示された。

##### 2) 定性試験

*E. coli*検査調査試料の定性試験の結果は表8に示したとおりであった。

冷蔵試料、常温試料ともに添加直後、添加29日後のどちらにおいても正しく判定が可能であったことから、定性試験への影響は無いと判断した。

## 2. 腸内細菌菌群検査

### 1) 生菌数の挙動

腸内細菌科菌群検査調査試料の生菌数の挙動は図6および表3に示したとおりであった。

*E. coli* (陽性)、*P. aeruginosa* (陰性)ともに冷蔵試料では添加直後から15日後以降の長期間において対数値1.0ポイント以内の減少傾向を示したことから、非常に安定な調査試料であることが示された。また常温試料では陽性、陰性試料ともに添加15日後の生菌数測定が可能であったことから、輸送時の温度上昇が起きても急激な菌数低下を認めない試料であることが示された。

### 2) 定性試験

腸内細菌科菌群検査調査試料の定性試験の結果は表9に示したとおりであった。

冷蔵試料、常温試料ともに添加直後、添加29日後のどちらにおいても正しく判定が可能であったことから、定性試験への影響は無いと判断した。

## 3. サルモネラ属菌検査

### 1) 生菌数の挙動

サルモネラ属菌検査調査試料の生菌

数の挙動は図7および表4に示したとおりであった。

*Salmonella* sp. (陽性)、*P. mirabilis* (陰性)ともに冷蔵試料では添加直後から15日後までの期間で対数値1.0ポイント以内の増減傾向を示したことから、非常に安定な調査試料であることが示された。また常温試料では陽性、陰性試料ともに添加15日後の生菌数測定が可能であったことから、輸送時の温度上昇が起きても急激な菌数低下を認めない試料であることが示された。

### 2) 定性試験

サルモネラ属菌検査調査試料の定性試験の結果は表10、表11に示したとおりであった。

冷蔵試料、常温試料ともに添加直後、添加29日後のどちらにおいても正しく判定が可能であったことから、定性試験への影響は無いと判断した。

## 4. 大腸菌群検査

### 1) 生菌数の挙動

大腸菌群検査調査試料の生菌数の挙動は図8から図12および表5から表7に示したとおりであった。なお大腸菌群では調査試料の作製から各菌3回繰り返し、その平均値で評価した。また図には標準誤差を示した。

*Aeromonas hydrophila*を除く5菌種の冷蔵試料では添加直後から14日後以降の長期間において対数値1.0ポイント以内の増減傾向を示したことから、非常に安定な調査試料であることが示さ

れた。また常温試料では添加14日後の生菌数測定が可能であったことから、輸送時の温度上昇が起きても急激な菌数低下を認めない試料であることが示された。

## 2) 定性試験

大腸菌群検査調査試料の定性試験の結果は表12に示したとおりであった。

*A. hydrophila*を除く5菌種では冷蔵試料、常温試料ともに添加直後、添加28日後のどちらにおいても正しく判定が可能であったことから、定性試験への影響は無いと判断した。

なお*A. hydrophila*は添加菌数が不足していたことから、添加直後のみ試験を実施し、本検討から除外した。

## E. 結論

技能試験に用いる調査試料に求める要件として、①公定法の試験操作で陽性・陰性の判定が可能であること、②実際の食品検査に近いマトリクスの基材で冷蔵保存可能であること、③冷蔵下で微生物の添加から14日以上安定の安定性が認められること（添加直後と添加14日後の差が対数値で±1.0ポイント以内）、④冷蔵から22.5℃（常温）に移管後も生菌数が測定可能であること、の4条件を挙げた。

本研究において、*E. coli*検査、腸内細菌科菌群検査及びサルモネラ属菌検査の調査試料では陽性、陰性菌ともに前述の4条件をクリアし、従来の添加菌濃度から低減した調査試料を技能試験に用いることの妥当性が示された。

添加菌濃度の低減と微生物の再検討を

併行して実施した大腸菌群検査の調査試料では、*Aeromonas hydrophila*を除く5菌種において前述の4条件をクリアし、従来の添加菌濃度から低減した調査試料を技能試験に用いることの妥当性が示された。

なお、本検討で技能試験に用いることの妥当性が示されたため、次年度（2021年度）から運用し、改善の要否判断を行うものとする。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

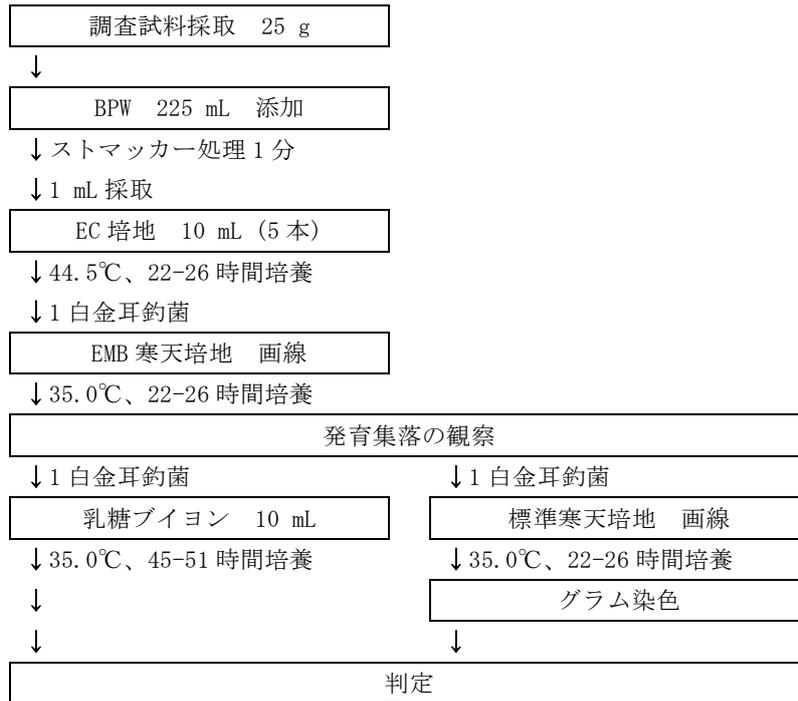


図1 E. coli 検査 試験手順

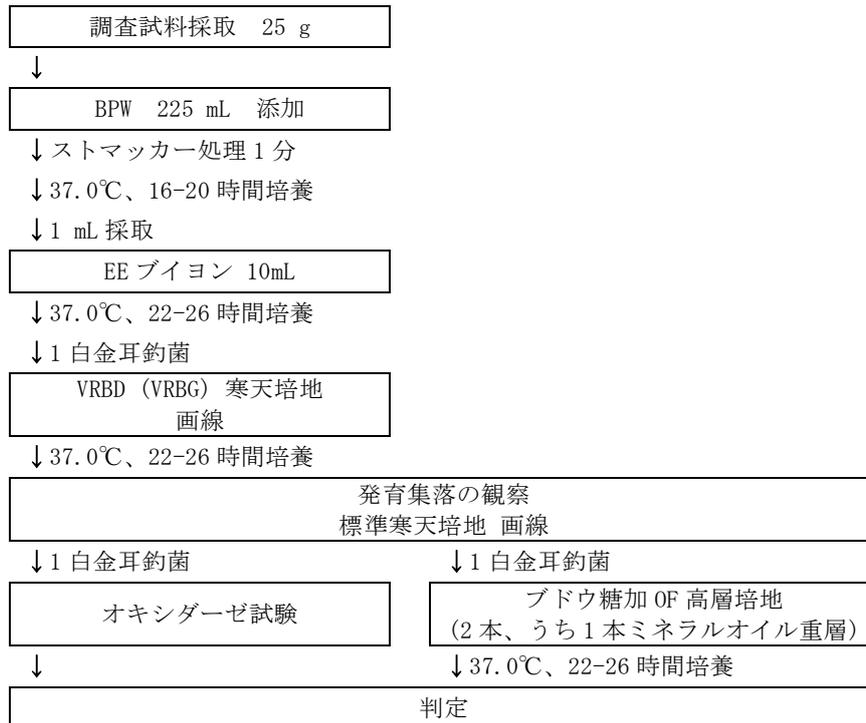


図2 腸内細菌科菌群検査 試験手順

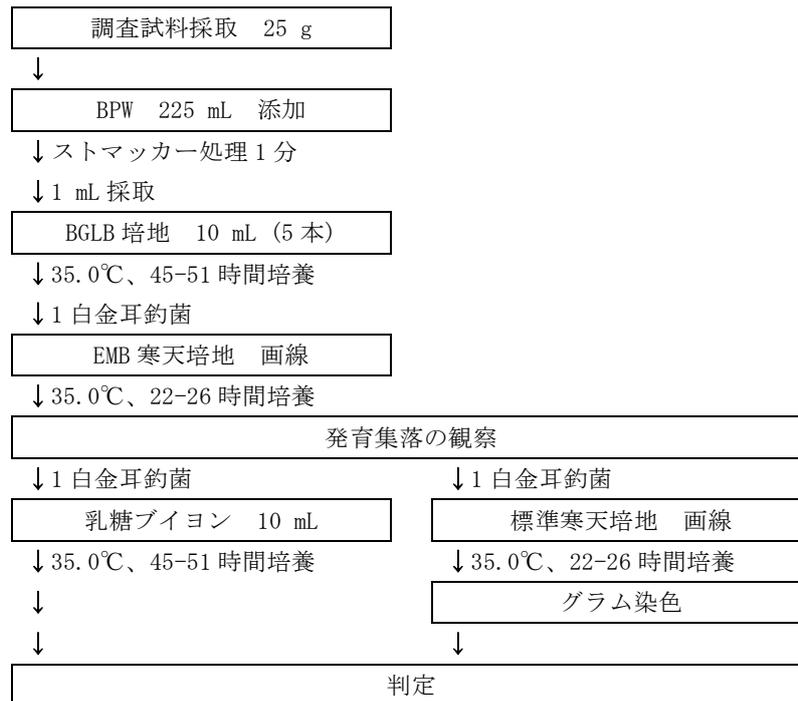


図3 大腸菌群検査 試験手順

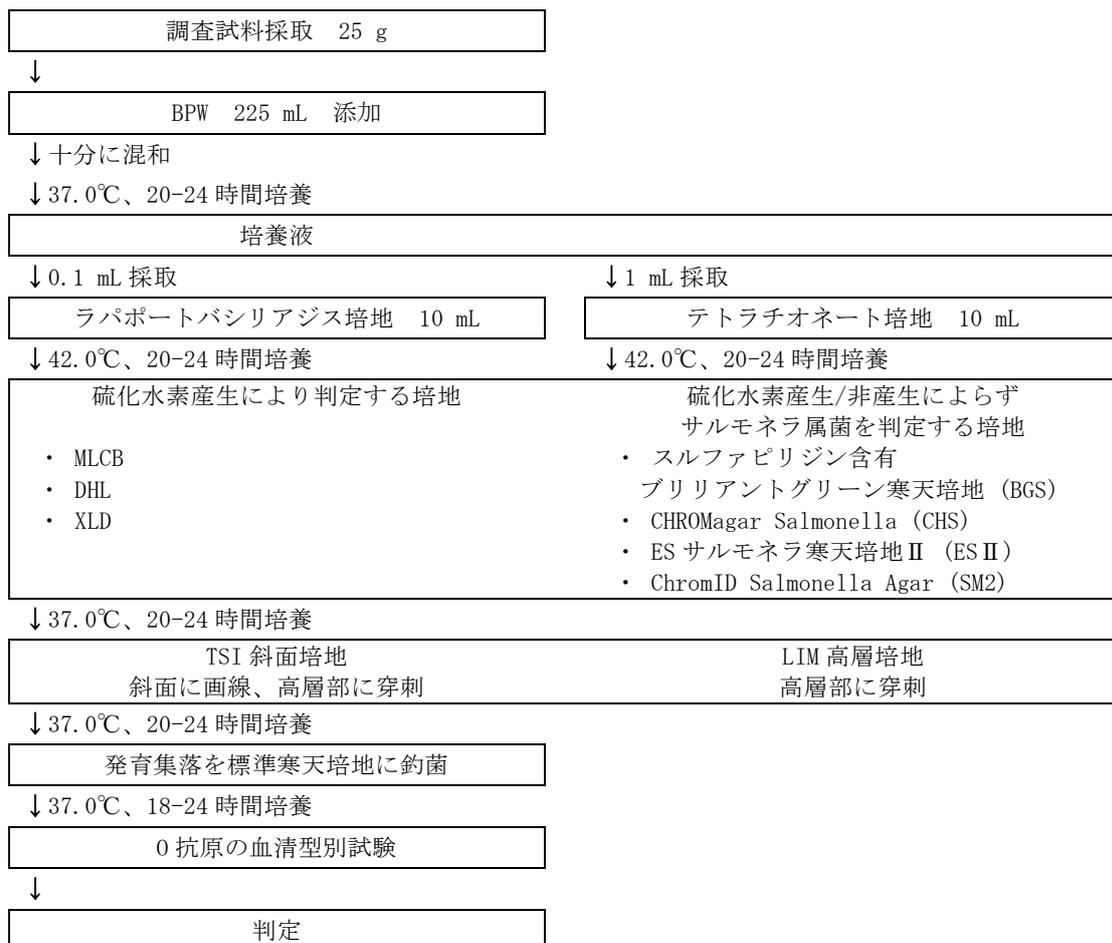


図4 サルモネラ属菌検査 試験手順

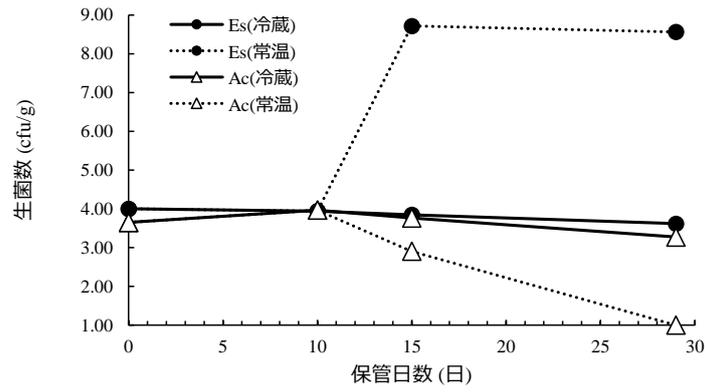


図 5 E.coli 検査 生菌数の挙動

(Es: *Escherichia coli* HIC 190367、Ac: *Acinetobacter calcoaceticus* HIC 190366)

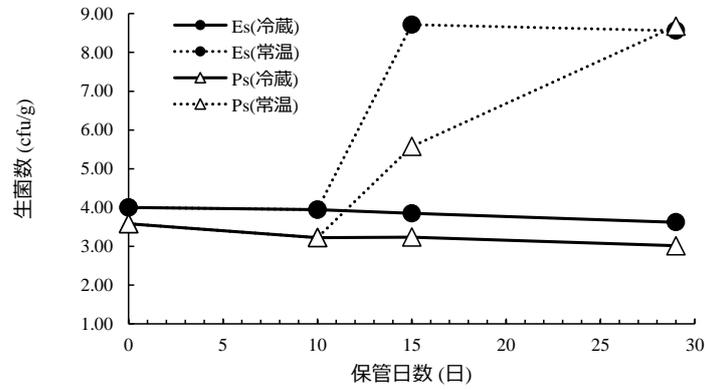


図 6 腸内細菌科菌群検査 生菌数の挙動

(Es: *Escherichia coli* HIC 190367、Ps: *Pseudomonas aeruginosa* HIC 190371)

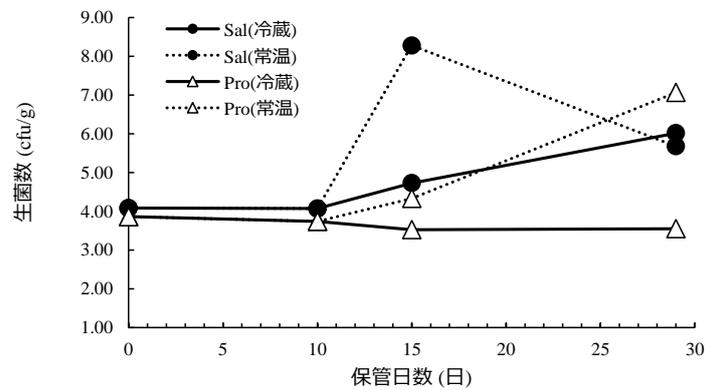


図 7 サルモネラ属菌検査 生菌数の挙動

(Sal: *Salmonella* sp. HIC 190364、Pro: *Proteus mirabilis* HIC 190368)

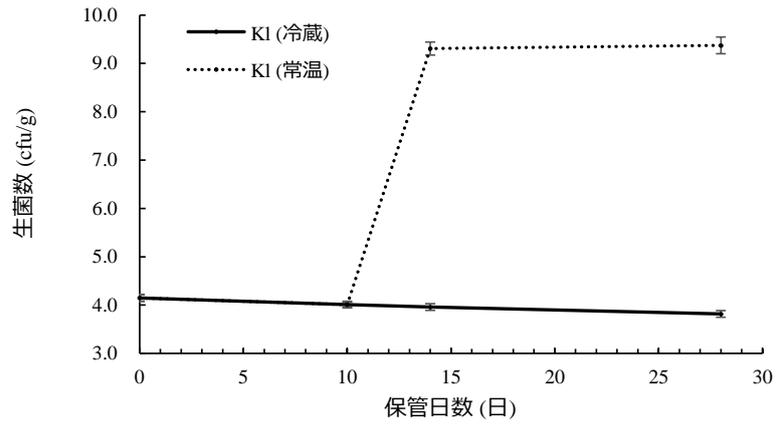


図 8 大腸菌群検査 生菌数の挙動 (*K. oxytoca*)

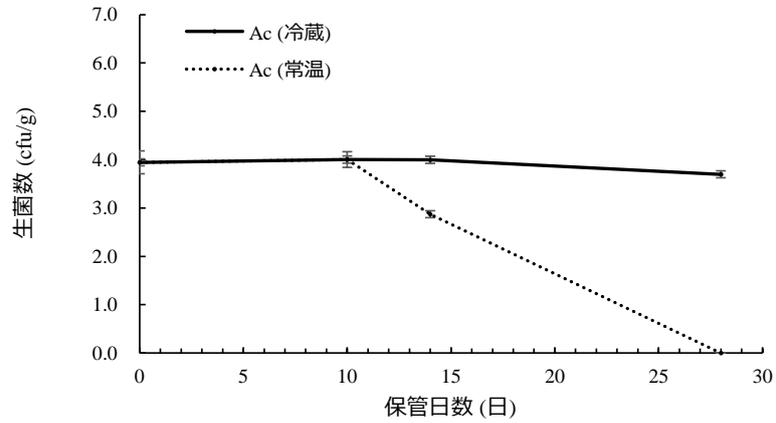


図 9 大腸菌群検査 生菌数の挙動 (*A. calcoaceticus*)

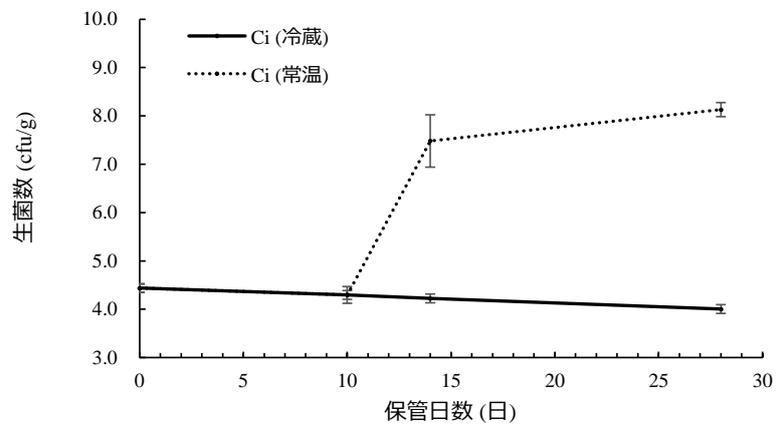


図 10 大腸菌群検査 生菌数の挙動 (*C. freundii*)

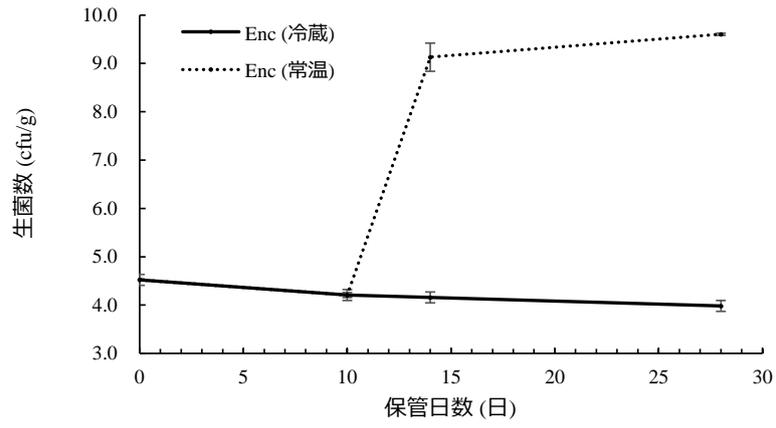


図 11 大腸菌群検査 生菌数の挙動 (*E. cloacae*)

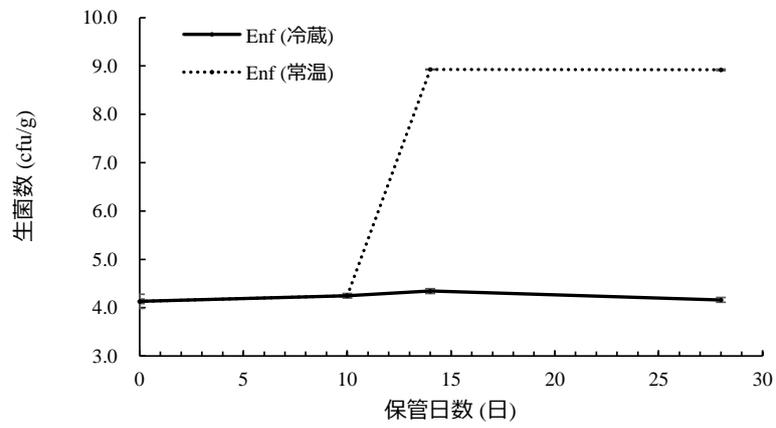


図 12 大腸菌群検査 生菌数の挙動 (*E. faecalis*)

表 1 調査試料の保管条件および試験内容

保管日数	冷蔵	温度変化試験 (22.5℃ (常温))
0 (添加直後)	● (添加後、保管せずに試験実施)	
10	○	(冷蔵から移管)
14 (または 15)	○	○
28 (または 29)	●	●

●: 生菌数測定および定性試験を実施。

○: 生菌数測定のみ実施。

表 2 調査試料の生菌数の挙動 (E.coli 検査)

保管日数	Es (冷蔵)	Es (常温)	Ac (冷蔵)	Ac (常温)
0	4.00	—	3.65	—
10	3.94	—	3.97	—
15	3.85	8.72	3.76	2.90
29	3.62	8.56	3.27	<1.0

単位: cfu/g (対数値)

Es: *Escherichia coli* HIC 190367、Ac: *Acinetobacter calcoaceticus* HIC 190366

表 3 調査試料の生菌数の挙動 (腸内細菌科菌群検査)

保管日数	Es (冷蔵)	Es (常温)	Ps (冷蔵)	Ps (常温)
0	4.00	—	3.58	—
10	3.94	—	3.22	—
15	3.85	8.72	3.24	5.57
29	3.62	8.56	3.01	8.68

単位: cfu/g (対数値)

Es: *Escherichia coli* HIC 190367、Ps: *Pseudomonas aeruginosa* HIC 190371

表 4 調査試料の生菌数の挙動 (サルモネラ属菌検査)

保管日数	Sal (冷蔵)	Sal (常温)	Pro (冷蔵)	Pro (常温)
0	4.08	—	3.86	—
10	4.07	—	3.74	—
15	4.73	8.28	3.53	4.33
29	6.02	5.68	3.55	7.07

単位: cfu/g (対数値)

Sal: *Salmonella* sp. HIC 190364、Pro: *Proteus mirabilis* HIC 190368

表 5 調査試料の生菌数の挙動（大腸菌群検査-1）

保管日数	Kl (冷蔵)	Kl (常温)	Ac (冷蔵)	Ac (常温)
0	4.15	—	4.00	—
10	4.00	—	4.04	—
14	3.95	9.34	4.00	3.00
28	3.85	9.40	3.70	<1.0

単位: cfu/g (対数値)、3 回実施した測定値の平均値を示した。

Kl: *Klebsiella oxytoca* HIC 190365、Ac: *Acinetobacter calcoaceticus* HIC 190366

表 6 調査試料の生菌数の挙動（大腸菌群検査-2）

保管日数	Ci (冷蔵)	Ci (常温)	Enc (冷蔵)	Enc (常温)
0	4.45	—	4.53	—
10	4.34	—	4.20	—
14	4.23	7.80	4.18	9.22
28	4.00	8.16	4.00	9.61

単位: cfu/g (対数値)、3 回実施した測定値の平均値を示した。

Ci: *Citrobacter freundii* HIC 190378、Enc: *Enterobacter cloacae* HIC 190379

表 7 調査試料の生菌数の挙動（大腸菌群検査-3）

保管日数	Ae (冷蔵)	Ae (常温)	Enf (冷蔵)	Enf (常温)
0	<1.0	—	4.15	—
10	*	—	4.26	—
14	*	*	4.34	8.93
28	*	*	4.23	8.92

単位: cfu/g (対数値)、3 回実施した測定値の平均値を示した。

Ae: *Aeromonas hydrophila* HIC 190377、Enf: *Enterococcus faecalis* HIC 190381

\*: 添加した菌数が不足していたことから検討から除外し、試験を中止した。

表 8 調査試料の定性試験結果 (E.coli 検査)

保管日数	EC <sup>※1</sup>	EMB <sup>※2</sup>	LB <sup>※3</sup>	グラム染色	E.coli 判定 <sup>※4</sup>
1) <i>E. coli</i>					
0	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
29 (冷蔵)	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
29 (常温)	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
2) <i>A. calcoaceticus</i>					
0	-	-	-	グラム陰性無芽胞桿菌	陰性
29 (冷蔵)	-	-	-	グラム陰性無芽胞桿菌	陰性
29 (常温)	-	-	-	グラム陰性無芽胞桿菌	陰性

一試料に対し、n=5 で実施。

※1: 2 メーカーで実施。ガス産生陽性を陽性 (+)、それ以外を陰性 (-)と判定した。

※2: 金属光沢を伴う集落または黒色集落の発育を認めた場合に陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※3: 培地の黄変かつガス産生陽性を陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※4: EC 培地、EMB 培地、LB 培地で全て陽性 (+) かつグラム陰性無芽胞桿菌であった場合に E.coli 陽性と判定した。

表 9 調査試料の定性試験結果 (腸内細菌科菌群検査)

保管日数	VRBD (VRBG) <sup>※1</sup>	オキシダーゼ <sup>※2</sup>	ブドウ糖発酵性 <sup>※3</sup>	腸内細菌科菌群判定 <sup>※4</sup>
1) <i>E. coli</i>				
0	+	-	+	陽性
29 (冷蔵)	+	-	+	陽性
29 (常温)	+	-	+	陽性
2) <i>P. aeruginosa</i>				
0	+	+	- (ブドウ糖酸化)	陰性
29 (冷蔵)	+	+	- (ブドウ糖酸化)	陰性
29 (常温)	+	+	- (ブドウ糖酸化)	陰性

※1: 淡紅色～赤色または紫色の発育集落を認める場合に陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※2: チトクローム・オキシダーゼろ紙が青く変色した場合に陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※3: ブドウ糖加 OF 高層培地 (ミネラルオイル重層) で黄変を認めた場合に陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。好気培養で培地上部が黄変した場合は「ブドウ糖酸化」を表中に記載した。

※4: VRBD 寒天培地で陽性 (+)、オキシダーゼ陰性 (-)、ブドウ糖発酵性陽性 (+)の場合に腸内細菌科菌群陽性と判定した。

表 10 調査試料の定性試験結果 (サルモネラ属菌検査-1、*Salmonella* sp.)

保管日数	増菌培地 <sup>※1</sup>	選択培地 <sup>※2</sup>	TSI・LIM <sup>※3</sup>	O 抗原	サルモネラ属判定 <sup>※4</sup>			
0	RVB	+	DHL	+	+	+	O4 群	陽性
		XLD	+	+	+			
		MLCB	+	+	+			
		BGS	+	+	+			
		CHS	+	+	+			
		ES II	+	+	+			
		SM2	+	+	+			
	TT	+	DHL	+	+	+		
		XLD	+	+	+			
		MLCB	+	+	+			
		BGS	+	+	+			
		CHS	+	+	+			
		ES II	+	+	+			
		SM2	+	+	+			
29 (冷蔵)	RVB	+	DHL	+	+	+	O4 群	陽性
		XLD	+	+	+			
		MLCB	+	+	+			
		BGS	+	+	+			
		CHS	+	+	+			
		ES II	+	+	+			
		SM2	+	+	+			
	TT	+	DHL	+	+	+		
		XLD	+	+	+			
		MLCB	+	+	+			
		BGS	+	+	+			
		CHS	+	+	+			
		ES II	+	+	+			
		SM2	+	+	+			
29 (常温)	RVB	+	DHL	+	+	+	O4 群	陽性
		XLD	+	+	+			
		MLCB	+	+	+			
		BGS	+	+	+			
		CHS	+	+	+			
		ES II	+	+	+			
		SM2	+	+	+			
	TT	+	DHL	+	+	+		
		XLD	+	+	+			
		MLCB	+	+	+			
		BGS	+	+	+			
		CHS	+	+	+			
		ES II	+	+	+			
		SM2	+	+	+			

※1: ラポポートバシリアジス培地 (RVB) は 2 メーカーを使用。日本製薬製では全て発育集落を認めなかったため、OXOID 製のみ示した。テトラチオネート培地 (TT) は 1 メーカーを使用。各培地で増菌あり (+)、増菌なし (-)、判定不可 (/) を示した。

※2: DHL、XLD、MLCB は黒色集落、スルファピリジン含有ブリリアントグリーン寒天培地 (BGS) は無色透明の集落、CHROMagar Salmonella 寒天培地 (CHS) は藤色集落、ES サルモネラ寒天培地 II (ES II)、ChromID Salmonella 寒天培地 (SM2) はピンク色集落を陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※3: TSI 斜面培地は高層部黄変、黒変、ガス産生および斜面部赤変、LIM 高層培地は培地全体が紫変およびインドール重層時に接触部の赤変なし (インドール反応陰性) の場合に陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※4: いずれかの選択培地で陽性を示し、O 抗原血清型別試験で血清型別を決定できた場合にサルモネラ属菌陽性と判定した。

表 11 調査試料の定性試験結果 (サルモネラ属菌検査-2、*P. mirabilis*)

保管日数	増菌培地 <sup>※1</sup>	選択培地 <sup>※2</sup>	TSI・LIM <sup>※3</sup>	O抗原	サルモネラ属判定 <sup>※4</sup>		
0	RVB	/	DHL	-	-・-	なし	陰性
			XLD	-	-・-		
			MLCB	-	*		
			BGS	-	*		
			CHS	-	*		
			ES II	-	*		
			SM2	-	*		
	TT	/	DHL	-	*		
			XLD	-	*		
			MLCB	-	*		
			BGS	-	*		
			CHS	-	*		
			ES II	-	*		
			SM2	-	*		
29 (冷蔵)	RVB	/	DHL	-	-・-	なし	陰性
			XLD	-	-・-		
			MLCB	-	-・-		
			BGS	-	-・-		
			CHS	-	*		
			ES II	-	*		
			SM2	-	-・-		
	TT	/	DHL	-	-・-		
			XLD	-	-・-		
			MLCB	-	-・-		
			BGS	-	-・-		
			CHS	-	*		
			ES II	-	*		
			SM2	-	-・-		
29 (常温)	RVB	/	DHL	-	-・-	なし	陰性
			XLD	-	-・-		
			MLCB	-	-・-		
			BGS	-	-・-		
			CHS	-	*		
			ES II	-	*		
			SM2	-	-・-		
	TT	/	DHL	-	-・-		
			XLD	-	-・-		
			MLCB	-	-・-		
			BGS	-	-・-		
			CHS	-	*		
			ES II	-	*		
			SM2	-	-・-		

\*: 選択培地で発育集落を認めなかったため実施せず。

※1: ラポポートバシリアジス培地 (RVB) は2メーカーを使用。日本製薬製では全て発育集落を認めなかったため、OXOID 製のみ示した。テトラチオネート培地 (TT) は1メーカーを使用。各培地で増菌あり (+)、増菌なし (-)、判定不可 (/) を示した。

※2: DHL、XLD、MLCB は黒色集落、スルファペリジジン含有ブリリアントグリーン寒天培地 (BGS) は無色透明の集落、CHROMagar Salmonella 寒天培地 (CHS) は藤色集落、ES サルモネラ寒天培地 II (ES II)、ChromID Salmonella 寒天培地 (SM2) はピンク色集落を陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※3: TSI 斜面培地は高層部黄変、黒変、ガス産生および斜面部赤変、LIM 高層培地は培地全体が紫変およびインドール重層時に接触部の赤変なし (インドール反応陰性) の場合に陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※4: いずれかの選択培地で陽性を示し、O 抗原血清型別試験で血清型別を決定できた場合にサルモネラ属菌陽性と判定した。

表 12 調査試料の定性試験結果（大腸菌群検査）

保管日数	BGLB <sup>※1</sup>	EMB <sup>※2</sup>	LB <sup>※3</sup>	グラム染色	大腸菌群判定 <sup>※4</sup>
1) <i>K. oxytoca</i>					
0	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
29 (冷蔵)	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
29 (常温)	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
2) <i>A. calcoaceticus</i>					
0	-	-	-	グラム陰性無芽胞桿菌	陰性
29 (冷蔵)	-	-	-	グラム陰性無芽胞桿菌	陰性
29 (常温)	-	-	-	グラム陰性無芽胞桿菌	陰性
3) <i>C. freundii</i>					
0	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
29 (冷蔵)	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
29 (常温)	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
4) <i>E. cloacae</i>					
0	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
29 (冷蔵)	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
29 (常温)	+	+	+	グラム陰性無芽胞桿菌	陽性
5) <i>A. hydrophila</i>					
0	-	-	-	グラム陰性無芽胞桿菌	陰性
29 (冷蔵)	*	*	*	*	*
29 (常温)	*	*	*	*	*
6) <i>E. faecalis</i>					
0	-	+	- <sup>※5</sup>	グラム陽性球菌	陰性
29 (冷蔵)	-	+	- <sup>※5</sup>	グラム陽性球菌	陰性
29 (常温)	-	+	- <sup>※5</sup>	グラム陽性球菌	陰性

\*: 添加した菌数が不足していたことから検討から除外し、試験を中止した。

※1: ガス産生を認める場合に陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※2: 金属光沢を伴う集落または黒色集落の発育を認めた場合に陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※3: 培地の黄変かつガス産生陽性を陽性 (+)、それ以外を陰性 (-) と判定した。

※4: BGLB 培地、EMB 培地、LB 培地で全て陽性 (+) かつグラム陰性無芽胞桿菌であった場合に *E. coli* 陽性と判定した。

※5: 培地の黄変を認めたがガス産生を認めなかったため陰性と判定した。

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物試験法の  
妥当性評価法に関する研究

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 部長
研究分担者	石井 里枝	埼玉県衛生試験所
研究協力者	吉田 栄充	埼玉県衛生研究所
	島田 慎一	埼玉県衛生研究所
	今井 浩一	埼玉県衛生研究所
	千葉 雄介	埼玉県衛生研究所

#### 研究要旨

微生物定性試験法の検出下限値として $LOD_{50}$ を推定することにより、比較可能な試験性能の指標を定めることを目的とし、食品衛生法の冷凍食品の規格基準に定められたE. coli試験法を対象として検討を行った。2倍段階希釈した*Escherichia coli*菌液を食品試料に接種し、E. coli試験法を各濃度 $n=6$ で実施した結果、陽性と判定された試料数から $LOD_{50}$ を算出した。食品試料は、オクラ、ホウレン草、エビピラフ、からあげ、生うどん、白菜の浅漬けを対象として供試した。本研究の結果、得られた $LOD_{50}$ は14~27 cfu/gであった。この菌濃度はEC発酵管への接種菌量に換算すると0.42~0.81 cfuであることから、E. coli試験法は高い検出感度であることを示した。

食品添加物、残留農薬等については食品衛生法で規格基準が定められており、各自治体では食の安全を確保するために食品衛生監視指導計画に則り、流通している食品等について収去検査が行われている。自治体の各試験所で採用している試験法は、それぞれの試験所ですでに発出されている妥当性評価ガイドラインに則って、その妥当性を確認している。しかし、食品添加物試験法の妥当性評価のためのガイドラインは適用する加工食品の多様性もあり、未だ、発出されていない。

妥当性評価の対象とすべき食品は基本的に試験所へ搬入される食品を対象として妥当性評価がなされるべきであるが、食品添加物は使用される加工食品が多種多様であること、また、同じ食品種であっても製造者ごとに食品のマトリクスが異なることから、多種類の食品を対象としてモニタリング検査を行っている自治体の試験所にとって、対象食品の選定は難しい。

そこで、今回、「食品中の食品添加物分析法」で通知されている6つの試験法について単一試験室における添加回収試験を実施し、妥当性評価の対象とするべき代表的食品種について考察した。

## 微生物定性試験法における検出

### 下限値の推定

#### A. 研究目的

食品の微生物基準は、定められた試験法によって検出される微生物を対象とした定義法であり、基準適合性試験は公定法に則る必要がある。ISO/IEC 17025:2017では「試験室が新たな試験法を導入する際に、その方法を適切に実施できることを検証すること」とあり、公定法の導入前に試験性能の検証が求められている。

一般に、定性試験の性能評価には検出下限値が使われるが、微生物試験においては、試料中の微生物分布が均一でなく、採取部位に対象菌が含まれる確率が検出の可否を決めるため、確実に検出可能な下限値を求めるのは難しい。ISO 16140-3:2021では、単一試験室における参照試験法導入時の検証手順が定められており、微生物定性試験法の性能評価の指標として、実施試験の50%が陽性となる菌量である $LOD_{50}$  (level of detection) を用いている。妥当性確認時に算出した $LOD_{50}$ と比較することにより、試験所で導入した試験法が要求される性能を満たしているか検証することができる。

日本の公定法は、サルモネラ、黄色ブドウ球菌等、一部の試験において標準試験法として妥当性確認が行われたが、E. coli等の衛生指標菌などは整備が進んでいない試験法が多い。また、妥当性確認された標準試験法においても、 $LOD_{50}$ が明記されておらず、試験性能の比較ができない。

そこで本研究では、微生物定性試験法の $LOD_{50}$ を推定することにより、比較可能な試験性能の指標を求めることを目的とした。令和2年度はE. coli試験法を対象として $LOD_{50}$ の推定を行った。E. coliは、冷凍食品、食肉製品、生食用かき、弁当及びそうざい、生めん類、漬物と幅広い食品分類に基準が設けられており、2019年度の埼玉県における食品衛生法に基づく微生物除去検査では、619検体中312検体でE. coli試験を実施している。E. coli試験法は食品分類によって異なる試験方法が記載されているが、本研究では、冷凍食品の規格基準に定められた試験法を対象として検討を行った。

#### B. 方法

##### 1. 試験法概要

2倍段階希釈した*Escherichia coli*菌液を食品試料に接種し、E. coli試験法を各濃度 $n=6$ で実施した結果、陽性と判定された試料数から $LOD_{50}$ を算出した。

##### 2. 菌接種試料の調製

対象とした食品試料は、食品衛生法においてE. coliの基準が定められている食品区分から、夾雑菌の存在、油分、pH等を考慮し、オクラ、ホウレン草、エビピラフ、からあげ、生うどん、白菜の浅漬けを供試した。各試料の詳細は表1に記載した。からあげは食肉製品を使用した。本研究では加熱そうざいとして試験に供した。

試料への接種菌株は、BioBall HD 10K *Escherichia coli* NCTC9001 (ビオメリュー社)を使用した。本製品は1粒に約10000 cfu (使用ロットのメーカー規定

値は9146 cfu)の*E. coli*が含まれており、3粒を滅菌リン酸緩衝液 (pH7.2) (株式会社LSIメディエンス製20倍濃縮液から調製) 30 mLに懸濁したものを接種菌原液とした。接種菌原液を滅菌リン酸緩衝液15 mLで2倍段階希釈を繰返し、2、4、8、16倍希釈し接種菌液とした。滅菌ストマッカー袋に採取した試料25 gに、接種菌原液又は接種菌液を2 mLずつ接種した。すなわち、接種後の試料中の菌量 ( $d_1 \sim d_5$ ) をそれぞれ73、37、18、9.1、4.6 cfu/gとなるよう調製した。手技によるバラつきの検討には、食品の代わりにリン酸緩衝液25 mLを試料として用いた。

### 3. *E. coli*試験

試験方法は、食品衛生法における食品、添加物等の規格基準に定められている冷凍食品の*E. coli*の試験法に準じた。菌接種試料25 gに滅菌リン酸緩衝液225 mLを加えてストマッキング後、その10 mLを滅菌リン酸緩衝液90 mLに加えて混和し、100倍希釈液とした。3本のEC発酵管 (栄研化学株式会社製粉末培地から調製) に100倍希釈液各1 mLを接種し、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で $24 \pm 2$ 時間培養した。1本以上のEC発酵管にガス産生が認められた場合、*E. coli*試験陽性と判定した。菌接種試料1検体につき各濃度 $n=6$ で試験を実施した。さらに、日を変えて同様の試験を繰返した。

### 4. $LOD_{50}$ の推定

$LOD_{50}$ の算出方法はISO 16140-2:2016記載されており、その引用元であるWilrich<sup>1)</sup>らの手法に準じて $LOD_{50}$ を推定した。ポアソン分布より導出した以下の式から

$LOD_{50}$ を推定した。

$$LOD_{50} = -\frac{\ln 0.5}{0.03F}$$

ここで、F値は検出感度に影響を与える食品固有の値であり、食品中の菌濃度 $d_i$ での*E. coli*試験の陽性試料数 $y_i$ を以下の方程式に代入し、その解によりF値を求めた。

$$\sum_{i=1}^5 \left( \frac{y_i d_i}{\exp(0.03F d_i) - 1} - (6 - y_i) d_i \right) = 0$$

## C. D. 研究結果および考察

### 1. 手技によるバラつきの検討

食品への菌添加試験を実施する前に、食品試料の代わりに滅菌リン酸緩衝液を用いて、繰返し試験、異なる試験担当者間による結果を比較することで、手技によるバラつきについて検討した。1人の試験担当者が4回、2人の担当者が1回ずつ試験を実施した。その結果、F値は0.75~1.2、 $LOD_{50}$ は19~31 cfu/mLであった

(表2)。F値は検出感度に与える影響の度合いを示しており、1に近いほどEC発酵管への接種菌量は理想的なポアソン分布に近づく。F=1のとき、 $LOD_{50}$ は23

cfu/gと算出される。F=1のときの $LOD_{50}$ と比較すると今回の結果は0.83~1.3倍であった。以下の実験では19~31 cfu/gを $LOD_{50}$ の基準として、2回の試行の両方がこの範囲に収まらなかった場合、食品マトリクスによる影響があると判定した。

### 2. 食品マトリクスごとの $LOD_{50}$ の推定

食品ごとの*E. coli*試験の陽性試料数及び $LOD_{50}$ を表3に示した。 $LOD_{50}$ が最大であったのはオクラで27 cfu/g、最小はエビピラフで14 cfu/gであった。エビピラフ、白菜の塩漬け $LOD_{50}$ が2回の試行とも

19 cfu/g未満であり、食品マトリクスの影響により検出感度が高くなったと考えられた。

諸藤ら<sup>2)</sup>によれば、生菌数試験において粉末試料の拡張不確かさは、液体試料のほぼ2倍と報告している。ストマッキング後のエビピラフの希釈液は細かくなった試料により白濁しており、粉末試料に近い状態になったことが検出感度に影響したのではないかと考えられた。同様に希釈液が白濁した生うどんは、2回目の試行で判定基準内に収まっているが、試料中の菌量が少ない $d_2$ の方が、 $d_1$ の陽性検体数を上回っており、食品マトリクスによる不確かさが影響したと考えられた。白菜の塩漬はpHによる影響を検討するため試験に供したが、製品中のpHは5.3であったのに対し、10倍希釈液中のpHは7.3で緩衝液のpHになっていたため、EC発酵管での培養にpHの影響はなかったと考えられ、検出感度が高くなった理由は不明であった。

オクラ、ホウレン草は夾雑菌の存在、からあげは油分が検出感度に与える影響を考えて検討したが、手技による変動と比較して大きな差は認められなかった。この結果から、夾雑菌の存在、油分はE. coli試験における検出感度には影響を与えないと推察された。

他の微生物定性試験であるサルモネラ属菌試験は、試料25 gと培地225 mLを混和し、そのまま培養するため、採取した食品中に含まれた菌が損なわれずに培養される。一方、E. coli試験法は10倍希釈液調製後、さらに100倍希釈液を調製し、そこからEC発酵管に接種するため、より

多くの手順を経ることから、作業工程にて対象菌が減少することが想定された。しかし、 $F=1$ のときと比較すると0.60～1.2倍であり、食品によってはより少ない菌量でも検出可能であった。

## E. 結論

本研究で供試した食品試料においては、食品衛生法で定められた冷凍食品のE. coli試験法の $LOD_{50}$ は14～27 cfu/gであった。この菌濃度はEC発酵管への接種菌量に換算すると0.42～0.81 cfuであり、EC発酵管中に1個以上の菌が存在すれば、検出可能であると推察され、定性試験の検出感度としては十分であると考えられる。

ISO 16140-3:2021では、参照試験法の導入時には、バリデーション時の結果と比較し、 $LOD_{50}$ が4倍未満であることが許容限界とされている。本研究の結果が、各試験室におけるE. coli試験法の性能評価の指標として活用されることが期待される。

## 参考文献

- 1) Wilrich C. et al: J AOAC Int., 92(6), 1763-72 (2009).
- 2) 諸藤ら: 第31回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 61(2010)

## 食品添加物試験法の妥当性評価法

### A. 研究目的

食品添加物試験法は平成12年3月30日付け衛化第15号通知「食品中の食品添加物分析法」(令和元年6月28日改正)で示されており、別添1 試験 8には「食品

添加物分析法各条に掲げる食品添加物分析法（「以下「規定分析法」という。）に代わる方法で、それが、規定分析法以上の精度ある場合には、その分析法を用いることができる。ただし、その結果に疑いのある場合には、規定分析法で最終の判定を行う。」と規定されている。しかし、その同等性の判断基準を示す妥当性評価ガイドライン等は現在のところ厚生労働省から発出されていない。

食品衛生法にかかる試験法の妥当性評価のためのガイドラインとして、平成19年11月15日食安発1115001号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」が厚生労働省から初めて示された。本ガイドラインでは残留農薬及び動物用医薬品を分析対象物質としている。また、その後、「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」（平成20年9月26日付け食安発第0926001号）、「総アフラトキシンの試験法 II 妥当性評価の方法」（平成23年8月16日付け食安発0816第1号）、「食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドライン」（平成26年12月22日付け食安発1222第7号）などが厚生労働省から示されている。それぞれ玄米中のカドミウムや通知試験法で示す食品中の金属、食品中のアフラトキシンの、清涼飲料水、粉末清涼飲料、寒天及び穀類に含有される有害物質を対象としている。概して食品の汚染物質であり、その含有される濃度はmg/kg以下のレベルである。

一方、食品添加物については、一般的に使用される濃度は概ね100～5000 mg/kg 程度であり、既発のガイドライン

の評価基準を外挿することは適当ではないと考えられた。

採用している食品添加物試験法の妥当性を評価しようとする場合、対象とすべき食品は試験所へ実際に搬入される食品について実施されるべきであるが、食品添加物が使用される加工食品は多種多様であり、また、同じ食品種であっても製造者ごとにその食品のマトリクスも異なる。多品目のモニタリング検査を行っている自治体の試験所では妥当性評価の対象食品について、どのような判断基準で選定するか悩ましいところである。

そこで、今回、規定分析法について、添加回収試験等を行い、真度及び精度のデータから試験法の頑健性等を確認し、適用できる食品、できない食品、あるいは、個人の技量や分析実施時の試験室環境の雰囲気によって結果に違いが出るような食品種を明らかにし、妥当性評価の対象とすべき代表的な食品を選定することを試みた。

## B. 方法

### 1. 評価対象とする食品添加物及び食品の種類を選定

#### （1）対象食品添加物の選定

輸入時及び国内における令和元年度輸入食品違反事例<sup>1)</sup>を基に、違反事例が多く、優先的に検討すべき添加物を検討した。「TBHQ」、「サイクラミン酸」、「ソルビン酸」、「二酸化硫黄及び亜硫酸塩類」の4種を選定した。

#### （2）対象食品種の選定

食品添加物の使用量、試験法の特性、既報<sup>2～14)</sup>で示されている真度、精度及び

妨害ピークの有無等の報告内容を考慮し、それぞれの食品添加物について妥当性評価を行うべき対象食品種を幅広く選定した。

## 2. 分析方法

規定分析法に則って実施した。サイクラミン酸試験法については固相抽出による精製があるものと省略した方法(スクリーニング試験法)を実施した。二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法についてはアルカリ滴定法と比色法の2つの方法を実施した。

## 3. 性能評価基準

CODEX及びAOACのガイドライン<sup>15,16)</sup>で示されている性能評価基準を参考に、表4の性能基準に従って評価を行った。

## 4. 添加回収試験

対象とする食品添加物が含有されていない食品を試料とした。試料は2. 分析方法に従って、試験溶液を調製し、分析に供した。測定を妨害するピークや滴定の妨害の有無を確認し、選択性を評価した。1人1日5回、2名で2日間(一部、3日間実施)添加回収試験を実施し、真度、併行精度及び室内精度を算出した。

なお、添加濃度は原則、それぞれの食品種の基準値濃度とした。指定外添加物の添加濃度は規定分析法の通知に記載のある精度管理時の添加濃度とした。

## C. D. 研究結果および考察

### 1. 評価対象とする食品添加物及び食品の種類を選定

#### (1) 対象食品添加物の選定

指定添加物は、対象食品や使用基準が

定められており、食品の加工・製造業者はそれを遵守しなければならない。また、指定外添加物は日本では使用が認められていない添加物であるが、海外等で使用が認められているものもあり、輸入食品等で違反事例が散見されている。いずれも毎年、検疫所や自治体等の検査で違反が発見され、自主回収等の措置が講じられている。

令和元年度の検疫所及び国内で発見された輸入食品の食品添加物の違反事例は154件であり、そのうち指定外添加物が59件、指定添加物の使用基準違反は95件であった。

指定外添加物で最も違反件数の多かったのは酸化防止剤のTBHQで25件であり、含有されていたのは菓子類(14件)、野菜加工品(5件)等であった。次に違反件数の多かったものは、甘味料のサイクラミン酸が12件で、食品の種類は多岐にわたっていた。続いてヨウ素強化剤のヨウ素化塩が8件で菓子類から検出された。

指定添加物の使用基準違反95件の内訳は保存料のソルビン酸(カリウム)が37件で、食品は酒類(9件)、菓子類(8件)、調味料(4件)等であった。次に多かったものは漂白剤・保存料・酸化防止剤の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の15件であり、食品はえび(3件)、乾燥野菜・果実(3件)、漬物(3件)等に使用されていた。次に甘味料のアセスルファミウムが11件と続き、食品は糖類(7件)、水産物・農産物加工品(3件)であった。次が保存料の安息香酸ナトリウムで7件であり、食品は多岐にわたっていた。

以上の結果から、評価対象とする食品

添加物は指定外添加物のTBHQ及びサイクラミン酸、指定添加物のソルビン酸、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類とした。

## (2) 対象食品種の選定

### 1) TBHQ

TBHQは指定外添加物であるが、海外ではさまざまな食品に使用が許可されていることから、さまざまな食品で違反事例として検出されている。令和元年度の違反事例では菓子や野菜加工品での違反事例が多かったため、これらを中心に対象食品を検討した。

一方、野村らはゴマやピーナッツバターを含む食品では食品由来成分によって分析が妨害されると報告している<sup>2)</sup>。また、竹内らは煮干し、さきいか等で十分な回収率が得られないことを報告している<sup>3)</sup>。これらのことから、対象食品はごま油、ピーナッツバター、煮干し、クッキー、ポテトチップス、イカ燻製、チリソースの7食品とした。

### 2) サイクラミン酸

サイクラミン酸も指定外添加物であり、海外では多種類の食品に使用されており、令和元年度の違反事例においても、菓子類、スープ類、調味料などさまざまな食品種から検出されている。

一方、竹内らはたくわんで十分な回収率が得られなかったことや<sup>3)</sup>、山口らはジャム、ビスケット、チョコレートでは85～110%の回収率が得られたが、漬物類(しょうゆ漬け、ニンニクの酢漬け、キャベツの葡萄酒漬け、らっきょうの酢漬け、たくわん漬け)では25～65%の低い回収率であったことを報告している<sup>4)</sup>。山田らはぶどうジュースでは精製に用い

る固相カートリッジのロットによって回収率にばらつきで出ることやヘキサンの分離時にエマルジョンが形成されることを報告している<sup>5)</sup>。山口らは食酢ではサイクラミン酸がODSカラムに吸着されることを報告している<sup>6)</sup>。以上のことから対象とする食品はたくわん漬け、らっきょう漬け、ジャム、ビスケット、ぶどうジュース、米酢、みかんシロップ漬け、チョコレートの8食品とした。

### 3) ソルビン酸(カリウム)

ソルビン酸は指定添加物であり使用基準が定められていることから、基準のある食品のうち、消費量の多い食品等を中心に選定した。

小川らは水蒸気蒸留法と透析法を比較し、ちくわやいか燻製品で透析法と比較して、蒸留法では回収率が低かったと報告している<sup>7)</sup>。また、山上らはさつま揚げ、ウインナーで回収率が約80～85%程度であったこと報告している<sup>8)</sup>。佐藤らは蒸留の留出速度が遅いと蒸留に時間がかかるだけでなく妨害物質が増加する傾向があることや、さきいかの回収率が、約88%と低いことを報告している<sup>9)</sup>。以上のことから、チーズ、ちくわ、さつま揚げ、ウインナー、マーガリン、らっきょう漬け、ワイン、オレンジジュース、イカ燻製、ビスケットの10食品を対象食品とした。

### 4) 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は指定添加物であり、使用基準が定められている食品のうち、消費量の多い食品等を考慮し、選定した。また、鈴木らは乾燥果実では、留出に十分な時間が必要であるこ

とを報告している<sup>10)</sup>。以上のことからかんぴょう、干しトマト、干しマンゴー、干しブドウ、ワイン、甘納豆及び冷凍えびの7食品を対象食品とした。

## 2. 評価基準

CODEXのガイドライン<sup>15)</sup>では対象物質の濃度として1000 mg/kg以下では真度95～105%、室内精度12%以下、AOACのガイドライン<sup>16)</sup>では1000 mg/kg濃度で真度は90～108%、併行精度は3%未満、室内精度は6%未満と基準が示されている。これらの評価基準を参考に、真度及び精度の性能基準の目安を表4のとおり仮定し、評価を行った。

## 3. 添加回収試験

各添加物の添加回収試験結果を表5～10に示す。

### (1) TBHQ試験法

TBHQ試験法の添加回収試験結果を表5に示す。真度は82.8～139.7%であった。竹内ら<sup>3)</sup>が報告しているように煮干しで82.8%と最も低い真度であった。操作中のTBHQの損失に留意する必要があることが考えられた。また、ごま油では139.7%の真度であったが、これはピーク近傍に観測される妨害ピークによるものと考えられた。ごま油では試験溶液注入後、約53、67、85分に、ピーナッツバター試料では約20分後に大きな夾雑ピークが出現し、分析カラムの洗浄等の操作が必要であった。野村ら<sup>2)</sup>もこれらの食品では食品由来成分による夾雑ピークが出現し、回収率の算出は不能であったと報告している。今後、これらの試料では追加精製等について検討する必要があると考えられた。

### (2) サイクラミン酸試験法

#### 1) サイクラミン酸試験法(固相カートリッジによる精製あり)

サイクラミン酸試験法の添加回収試験結果を表6に示す。規定分析法では試料10 gに対して水40 mLを添加し、沸騰水浴上で15分間加熱抽出することになっているが、ビスケット試料では餅状になってしまい、抽出が困難であった。試料量を少なくする、あるいは必要に応じて、80 mL程度の水の添加が必要と考えられた。今回は抽出時にガラス棒で攪拌しながら抽出操作を行った結果を示した。

また、米酢試料はまったく回収されなかった。理由として、米酢のpHは約3であったことから、酸性条件下でサイクラミン酸が陰イオン交換カートリッジに保持されなかったことやあるいはODSカラムに強固に結合し、溶出されなかったことが要因と考えられた。また、らっきょう漬けは回収されたものの真度が83.3%、併行精度が13.2%、室内精度は29.4%と真度も低くかつバラツキも大きかった。らっきょう漬けのpHも約4程度であり、米酢と同様の理由によって固相カートリッジへの保持が不安定であったことが考えられた。これらの試料では固相負荷時のpH調整により、真度及び精度の改善が図られるか今後、検討が必要であると考えられた。それ以外の試料では真度は87.2～93.4%であった。

また、チョコレート試料では塩素化誘導体化時にエマルジョンが発生し、併行精度が10.5%、室内精度が30.0%と高い結果であった。エマルジョンの発生防止等の改善により、精度の向上を図ってい

く必要があった。

ジャムについては、真度は性能基準を満たしたものの、併行精度及び室内精度は性能基準を超えた。後述するスクリーニング試験法では精度のバラツキは小さい結果であったことから、固相カートリッジ精製時にその原因があると考えられた。

たくわん漬け試料では真度が79.2%と低い結果であった。後述するスクリーニング試験法でも同様に真度が低かったことから抽出時に十分に回収されていないものと考えられた。

2) サイクラミン酸試験法 (スクリーニング試験法)

サイクラミン酸試験法(スクリーニング試験法)の添加回収試験結果を表7に示す。規定分析法では、「スクリーニング試験として、カートリッジによる精製を行わず誘導体化、HPLC分析を実施し、検出しないう場合はこれを分析結果とすることができる。」としている。固相カートリッジ精製で十分に保持が不安定であった米酢、らっきょう漬け試料でそれぞれ真度が108.5%、90.8%と改善された。一方、チョコレートでは93.4%の真度が、112.0%となるなど夾雑物によると思われる影響が観測された。

(3) ソルビン酸試験法

ソルビン酸試験法の添加回収試験結果を表8に示す。

平成22年5月28日付け食安基発第0528第3号により、「安息香酸および安息香酸ナトリウム、ソルビン酸およびその塩類ならびにデヒドロ酢酸ナトリウムの分析法」が改正された。佐藤は、従来法に比

べ、改正法は試料量を1/10へと減少させ、酒石酸溶液の量を増やすことによりイカ燻製試料では若干、低い真度であるが、その他の食品種では十分な真度が得られることになったと解説している<sup>9)</sup>。本検討においてはイカ燻製も含めて真度は93.2~97.8%、併行精度は0.5~3.9%、室内精度は0.5~5.9%と良好な結果であった。

(4) 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法

1) アルカリ滴定法

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法(アルカリ滴定法)の添加回収試験結果を表9に示す。規定分析法の解説にアルカリ滴定法ではマイクロバーナーの炎の強弱や窒素ガスの通気流量によって、真度に差がみられるとの記載があるが、本検討では真度は90.4~97.8%、併行精度は1.2~4.1%、室内精度は2.2~7.3%といずれも良好な結果であった。

2) 比色法

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法(比色法)の添加回収試験結果を表10に示す。本試験のみ1日一人、n=5回の添加回収試験を実施し、併行精度のみを検討した。比色法は、通知の「1. 分析法の概要」に「約0.1g/kg以下の食品に用いる。」と記載があり、本検討では原則、基準値濃度を添加することとしていたが、検量線の濃度範囲が0.4~2 mg/Lであることを考慮して、試験溶液中濃度として1 mg/L、試料中濃度としては0.01 g/kgとなるように添加回収試験を実施した。検討した試料の中で、冷凍エビが約141%、ワインが約184%と高い真度であった。ワインについては、亜硫酸不使用

の表示のある他の製品や同一ワインの別ロットについても検討したが、同様に真度が高値を示した (data not shown)。干しマンゴーでは真度が約113%、併行精度が約17%と高値であった。以上の結果から試験溶液の希釈操作の追加や高値の真度、精度の試等について今後、検討が必要であると考えられた。

## E. 結論

TBHQ試験法では規定分析法が適用可能と考えられる食品はクッキー、ポテトチップ、いかくん及びチリソースであった。適用できないと考えられる食品はごま油及びピーナッツを含有する食品、煮干しであった。ごま油やピーナッツ含有の食品試料については追加精製が必要と考えられた。煮干しでは操作中のTBHQの損失防止を検討する必要があると考えられた。

サイクラミン酸試験法(精製操作あり)では、適用可能と考えられる食品はぶどうジュース、みかんシロップ漬けであった。適用できないと考えられる食品はたくわん漬け、らっきょう漬け、米酢、ジャム、ビスケット、チョコレートであった。米酢や漬物などの酸性試料では固相カートリッジへの負荷時のpH調整が必要であること、抽出時に添加する水を吸収するような試料(ビスケット等)では添加する水分量について検討が必要であること、チョコレート等では誘導体化時にエマルジョンを発生するためそれらの抑制について検討する必要があることが示唆された。

サイクラミン酸試験法(スクリーニング

試験法)では適用可能と考えられる食品はジャム、ぶどうジュース、米酢及びみかんシロップ漬けであった。適用できないと考えられる食品はたくわん漬け、ビスケット及びチョコレートであった。らっきょう漬けについては併行精度のみ性能基準を満足しなかった。

ソルビン酸試験法及び二酸化硫黄及び亜硫酸試験法のアルカリ滴定法では今回、検討した食品種すべてにおいて良好な真度及び精度が得られ、性能基準を満足する結果が得られ、適用可能な試料であると考えられた。

今後はTBHQ試験法、サイクラミン酸試験法及び二酸化硫黄の比色法の検討の結果、適用が困難と考えられた試料について試験法の改良等を検討していく予定である。

## 参考文献等

- 1) [https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryou/shokuhin/yunyu\\_kanshi/ihan/index.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html)
- 2) 野村ら：大阪府立公衆衛生研究所報, 50, 14-18 (2012).
- 3) 竹内ら：三重県保健環境研究所報, 55, 86-89 (2010).
- 4) 山口ら：大阪市環境科学研究所報告, 72, 13-18 (2010).
- 5) 山田ら：神奈川県衛生研究所研究報告, 33, 94-96 (2003).
- 6) 山口ら：大阪府公衆衛生研究所報, 49, 7-10 (2011).
- 7) 小川ら：東京都健康安全研究センター年報, 68, 171-175 (2017).
- 8) 山上ら：山梨県衛生環境研究所年報,

- 54, 49-51 (2010). なし
- 9) 佐藤：食品衛生研究, 60, 7-14 (2010).
- 10) 鈴木ら：福島県衛生研究所報, 33, 46-49 (2015).
- 11) 朝倉ら：日本食品化学学会誌, 24, 82-87 (2017).
- 12) 辻ら：食品衛生学会誌, 34, 303-313 (1993).
- 13) 関戸ら：神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 38-40 (2007).
- 14) 久保田ら：日本食品化学学会誌, 17, 54-61 (2010).
- 15) PROCEDURAL MANUAL, Eighteenth edition (Codex Alimentarius Commission) (2008).
- 16) AOAC Int, AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002).

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

以下 図表

表1. 食品試料の分類、菌添加前の生菌数及び E. coli 試験の結果

食品	食品区分	生菌数	E. coli 試験
オクラ	冷凍食品 凍結前未加熱加熱後摂取	$1.2 \times 10^4$ cfu/g	陰性
ホウレン草	冷凍食品 凍結前未加熱加熱後摂取	$3.2 \times 10^4$ cfu/g	陰性
エビピラフ	冷凍食品 凍結前未加熱加熱後摂取	300 cfu 未満	陰性
からあげ	冷凍食肉製品 加熱後包装	300 cfu 未満	陰性
生うどん*	生めん類	$7.2 \times 10^3$ cfu/g	陰性
	生めん	$5.6 \times 10^3$ cfu/g	陰性
白菜の塩漬け*	漬物	$3.1 \times 10^3$ cfu/g	陰性
	浅漬	$6.4 \times 10^3$ cfu/g	陰性

\* 生うどんと白菜の塩漬けは試行した2回の試験で別ロットの製品を使用したため、ロットごとに菌添加前の生菌数及び E. coli 試験を実施

表2. 食品マトリクス非存在下における繰返し試験、試験担当者ごとの E. coli 試験の陽性試料数結果及び LOD<sub>50</sub>

担当者	陽性試料数 (y)					F 値	LOD <sub>50</sub> (cfu/mL)
	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>4</sub>	d <sub>5</sub> *		
A	6	3	1	1	1	0.82	28
A	6	4	1	1	1	0.95	24
A	5	5	4	1	0	1.1	21
A	5	5	1	2	1	0.98	24
B	6	3	2	0	0	0.75	31
C	6	4	4	0	1	1.2	19

\* 試料中の菌量 : d<sub>1</sub>=73 cfu/mL、d<sub>2</sub>=37 cfu/mL、d<sub>3</sub>=18 cfu/mL、d<sub>4</sub>=9.1 cfu/mL、d<sub>5</sub>=4.6 cfu/mL

表3. 食品ごとの E. coli 試験の陽性試料数及び LOD<sub>50</sub>

食品	試行数	陽性試料数 (y)					F 値	LOD <sub>50</sub> (cfu/g)
		d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>4</sub>	d <sub>5</sub> * <sup>1</sup>		
オクラ	1	5	4	3	2	0	0.97	24
	2	5	3	2	1	1	0.75	31
	combined* <sup>2</sup>						0.86	27
ホウレン草	1	6	5	2	0	1	1.1	21
	2	5	5	4	5	0	1.6	14
	combined						1.4	17
エビピラフ	1	6	4	5	1	1	1.5	15
	2	6	6	3	2	1	1.9	12
	combined						1.7	14
からあげ	1	5	5	1	2	0	0.89	26
	2	6	3	2	3	1	1.1	21
	combined						1.0	23
生うどん	1	5	4	4	3	2	1.4	17
	2	4	6	1	2	0	0.84	28
	combined						1.1	21
白菜の塩漬け	1	6	4	4	3	1	1.6	14
	2	6	5	4	1	0	1.4	16
	combined						1.5	15

\*1 試料中の菌量 : d<sub>1</sub>=73 cfu/g、d<sub>2</sub>=37 cfu/g、d<sub>3</sub>=18 cfu/g、d<sub>4</sub>=9.1 cfu/g、d<sub>5</sub>=4.6 cfu/g

\*2 combined は 2 回の試行を同一の分布として LOD<sub>50</sub> を算出

表4 性能基準

濃度	真度 (%)	併行精度 (RSD <sub>r</sub> , %)	室内精度 (RSD <sub>R</sub> , %)
≥1 g/kg	90~108	6≥	12≥
1 g/kg≥	85~110	8≥	16≥

表5 TBHQ 添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
調味料	ごま油	0.20	139.7	0.4	0.4
ジャム類	ピーナッツバター	0.20	84.4	2.4	3.9
魚乾製品	煮干し	0.20	82.8	2.2	3.0
菓子	クッキー	0.20	89.6	1.3	2.6
菓子	ポテトチップス	0.20	89.5	0.9	6.4
菓子	イカ燻製	0.20	90.1	1.2	2.2
調味料	チリソース	0.20	85.8	3.7	3.7

表6 サイクラミン酸（精製操作あり）の添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
漬物	たくわん漬け	0.20	79.2	6.4	6.4
酢漬け漬物	らっきょう漬け	0.20	83.3	13.2	29.4
ジャム類	ジャム	0.20	88.6	8.5	16.7
菓子類	ビスケット	0.20	84.6	9.7	11.9
清涼飲料水	ぶどうジュース	0.20	92.3	4.3	10.0
調味料	米酢	0.20	0.0	-	-
果実加工品	みかんシロップ漬け	0.20	87.2	3.3	8.1
菓子	チョコレート <sup>※1</sup>	0.20	93.4	10.5	30.0

※1：n=5 3日間のデータから算出

N. T.：試験不能

表7 サイクラミン酸（スクリーニング法）の添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
漬物	たくわん漬け	0.20	74.3	4.3	6.2
酢漬け漬物	らっきょう漬け	0.20	90.8	12.7	14.1
ジャム類	ジャム	0.20	104.5	5.1	8.2
菓子類	ビスケット	0.20	104.2	4.1	4.1
清涼飲料水	ぶどうジュース	0.20	96.4	2.8	4.5
調味料	米酢	0.20	108.5	5.8	6.8
果実加工品	みかんシロップ漬け	0.20	89.1	4.3	5.0
菓子	チョコレート	0.20	112.0	6.0	24.5

※1：n=5 3日間のデータから算出

N. T.：試験不能

表8 ソルビン酸（カリウム）の添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
乳製品	チーズ	3.0	93.7	0.8	0.8
魚肉練り製品	ちくわ	2.0	94.4	0.5	3.5
魚肉練り製品	さつま揚げ	2.0	96.7	0.5	0.8
食肉製品	ウインナー	2.0	95.8	0.5	0.5
油脂	マーガリン	1.0	96.8	0.9	0.9
酢漬けの漬物	らっきょう漬	0.5	93.2	3.9	5.9
果実酒	ワイン	0.20	97.8	1.7	2.1
清涼飲料水	オレンジジュース	0.20	96.7	2.4	4.2
菓子	イカ燻製	1.5	95.0	0.9	1.4
菓子	ビスケット	0.2	94.0	1.8	1.8

表9 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（アルカリ滴定法）の添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
かんぴょう	干しかんぴょう	5.0	92.0	1.2	2.2
乾燥果実	干しトマト	2.0	94.6	1.6	5.0
乾燥果実	干しマンゴー	2.0	97.8	1.6	7.3
乾燥果実	干しブドウ	1.5	96.6	2.2	2.2
果実酒	ワイン	0.35	90.4	3.1	3.1
菓子	甘納豆	0.10	92.8	3.9	3.9
えび	冷凍えび	0.10	93.7	4.1	4.4

表10 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（比色法）の添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)
かんぴょう	干しかんぴょう	0.01	88.9	7.7
乾燥果実	干しトマト	0.01	88.1	6.5
乾燥果実	干しマンゴー	0.01	112.9	17.4
乾燥果実	干しブドウ	0.01	84.1	5.3
果実酒	ワイン	0.01	184.3	7.0
菓子	甘納豆	0.01	110.1	5.3
えび	冷凍えび	0.01	140.7	6.9

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 部長
研究分担者	村上 太郎	(地独) 大阪健康安全基盤研究所 主任研究員
研究協力者	紀 雅美	(地独) 大阪健康安全基盤研究所 主幹研究員
	吉光 真人	(地独) 大阪健康安全基盤研究所 主幹研究員
	昌山 敦	(地独) 大阪健康安全基盤研究所 主任研究員
	柿本 葉	(地独) 大阪健康安全基盤研究所 主任研究員
	村野 晃一	(地独) 大阪健康安全基盤研究所 研究員
	徳永 佑亮	(地独) 大阪健康安全基盤研究所 研究員
	山崎 朋美	(地独) 大阪健康安全基盤研究所 研究員

#### 研究要旨

アレルギーを引き起こす可能性のあるタンパク質は特定原材料として消費者庁からの通知（通知法）により、Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) を用いて測定される。検査対象となる加工食品中の原材料は多種多様であり、その夾雑物によって測定が影響を受ける場合もある。本研究では、これまでに特定原材料（小麦・落花生）の定量で影響が確認されてきたポリフェノールの一種である Proanthocyanidin (PAC) を含む試料について、測定阻害の影響を確認した。また、試料からの抽出効率を添加回収試験によって回収率として評価した。回収率の低下が確認された試料については、PAC との結合能が報告されている化合物を利用して、抽出法の改良について検討した。産地と加工法の異なるカカオまたはシナモンを含む食品について、ELISA キットの測定および抽出における夾雑物の影響を評価した。測定における評価の結果、小麦の測定では特定のタンパク質を対象としているキットで PAC による影響を受けやすい傾向が確認された。一方で、落花生の測定では複数のタンパク質を対象とするキットで PAC による影響を受けやすい傾向が確認された。抽出における影響を添加回収試験で評価した結果、十分な回収率が得られない試料が確認された。このため、PAC に結合能を示す Polyvinylpyrrolidone (PVP) と Gelatin を利用して抽出法の改良について検討した。カカオに小麦の標準溶液を添加して、重合度の異なる PVP を共存させて抽出を行ったところ、重合度の低い PVP K15 を 1 % 添加することによって、最も高い回収率が確認された。一方で、シナモンについては PVP の添加では十分な回収が確認されなかったが、Cold water fish skin 由来の Gelatin を 10 % 添加した場合には両キットで回収率の改善が確認された。今後は精度管理用試料の作成のために、適正資材と安定性の検討を行う必要がある。最

最終的には、改良した検査法を複数機関で評価することにより、より信頼性の高い検査法の確立に繋げる。

## A. 研究目的

食品表示法による食品表示基準(平成27年3月30日消食表第139号)では、28品目の原材料がアレルギーを含む食品として加工食品への表示が推奨されている<sup>1</sup>。28品目の原材料のうち卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かにの7品目は特定原材料と指定され、食品への表示が義務付けられている。

アレルギーを引き起こす可能性のあるタンパク質の測定には、消費者庁による通知(以下、通知法)によって、Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)がスクリーニング法として利用されている<sup>1</sup>。ELISAでは検査対象となるタンパク質に対する抗体の特異性を利用し、多くの原材料との交差性の有無が確認されているため、一般的には信頼性が高い。しかしながら、加工食品には多種多様な原材料が使用されており、その夾雑物が特定原材料の定量に影響を与える場合がある。

本課題では、これまでの研究の中で小麦と落花生の定量への影響が確認されてきたポリフェノール的一种であるプロアントシアニジン (Proanthocyanidin : 以下PAC)を含む試料について、特定原材料を正確に定量することを目的として、分析法の改良について検討を行う<sup>2,4</sup>。今年度はELISAによる小麦と落花生の定量について、カカオとシナモン中の夾雑物による測定阻害と試料からの回収率を評価した。回収率の低下が確認された試料については、PACとの結

合能が報告されている化合物を利用して抽出法を改良した。また、各試料に適した化合物を確認後に、抽出条件を最適化した。

## B. 方法

### 1. 試料

#### 1.1. 標準品調製用試料

小麦は国産小麦粉(ホクシン種)を入手して、標準品の調製まで冷蔵庫で保存した。落花生は国産生落花生(千葉半立種)を入手し、フードプロセッサーで粉砕した後に、標準品の調製まで冷凍庫で保存した。

#### 1.2. 測定阻害評価用試料

表1に生産国と加工法の異なるカカオを含む食品10試料(ココアパウダー5試料、ローストカカオ豆3試料、カカオニブ2試料)を、表2に生産国の異なるシナモンパウダー13試料(スリランカ産4試料、ベトナム産3試料、マレーシア産2試料、中国産2試料、インド産1試料、マダガスカル産1試料)に示す。試料は量販店もしくはインターネット通信販売サイトから購入し、測定阻害の評価のために使用した。ローストカカオ豆などの粉状ではない試料はフードプロセッサー(岩谷産業:IFM-700)によって粉砕後に冷凍庫で保存した。その他の試料は室温で保存した。

### 2 試薬

抽出法の改良に使用した Polyvinylpyrrolidone (以下PVP) 関連試

薬の一覧を表3に示す。GelatinはGelatin from Cold water fish skin (Merck)を使用した。N-Vinyl pyrrolidone (以下NVP)は冷蔵で保存し、その他の試薬は室温で保存した。

### 3 標準品

#### 3.1.標準品の調製

通知法に示されている標準品規格に記載の方法に従って、小麦粉と落花生からタンパク質を抽出した<sup>1</sup>。抽出には振とう機 (TAITEC : BR-23UM) と遠心機 (エッペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ : himac CR 21G) を使用した。

#### 3.2. 総タンパク質の定量による標準品規格の定量確認

抽出した標準品原液の総タンパク質濃度は2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス) を用いて定量した。定量後の標準品は添加回収試験用の標準溶液として200 µg/mLとなるように、FASTKIT™ エライザVer.IIIキット (日本ハム株式会社中央研究所 : 以下FASTKIT) もしくはFASPEKエライザIIキット (森永生科学研究所 : 以下FASPEK) に付属の抽出液によって、希釈して冷凍保存した。

#### 3.3. タンパク質の電気泳動 (SDS-PAGE) による標準品規格の定性確認

SDS-PAGE は電気泳動槽 XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific : 以下Thermo) によって、NuPAGE 12 % Bis-Tris Gel (Thermo) を使用して行った。分子量マーカーにはSeeBlue® Plus2 Pre-

Stained Standard (Thermo) を使用した。電気泳動後のゲルはタンパク質染色液 Simply Blue™ Safe Stain (Thermo) で染色した。

### 4. 特定原材料 (落花生・小麦) タンパク質の定量

特定原材料の定量は通知法に従って、ELISAにより実施した<sup>1</sup>。定量にはFASPEKとFASTKITを使用した。吸光度の測定はマイクロプレートリーダー Multiskan FC (Thermo) を使用し、ソフトウェア SkanIt Ver.2.51 (Thermo) を使用して、試料中のタンパク質濃度を計算した。

### 5 測定阻害因子の評価

#### 5.1 ELISA測定時の抗原抗体反応への影響の評価

試料抽出液中の夾雑物によるELISA測定への評価のために、希釈後の試料抽出液にキットに付属の標準溶液を6.25 ng/mLとなるように添加した。標準溶液と併行して測定を行い、添加濃度に対する回収率を評価した。

#### 5.2. 添加回収試験

試料からの抽出効率の評価のために、抽出前の各試料に標準溶液をタンパク質濃度として5 µg/gとなるように添加して抽出を行った。併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率を評価した。

#### 5.3 回収率の評価基準

回収率は通知法の (別添4) アレルゲンを含む食品の検査方法を評価するガイドラインに示されている定量法の試験室間バリデ

ーションの評価基準を参考として、回収率が50-150%の範囲にある場合は夾雑物による影響がないと評価した<sup>1)</sup>。

## 6. 改良抽出法の抽出条件の最適化

### 6.1. PVPによる抽出条件の最適化

カカオパウダーに落花生の標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、1% (w/v) の重合度の異なるPVP (K15、K25、K30、K60、K90) を抽出液に添加して評価を行った。また、PVPの単量体であるN-Vinylpyrrolidone (NVP) とPVPが架橋結合した不溶性高分子のPolyvinylpolypyrrolidone (PVPP) についても同様に評価を行った。タンパク質の添加濃度に対する回収率を評価し、PACに対する結合能が高いPVPを確認した。次に、カカオパウダーに落花生の標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、PVPを添加濃度0.25、0.5、1、2、4、10% (w/v) となるように調製して同様に評価を行い、回収率を比較してPVPの添加濃度を最適化した。

### 6.2. Gelatinによる抽出条件の最適化

シナモンからの抽出効率の改善にはCold water fish skin由来のGelatinが有効であることがこれまでに報告されている<sup>2)</sup>。シナモンパウダーに小麦もしくは落花生の標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、10% (w/v) のCold water fish skinを抽出液に添加して評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では実験動物や生体試料などの取扱いはないため、倫理面に配慮する研究には該当しない。

## C. D. 研究結果および考察

### 1. 標準品の調製

#### 1.1. 小麦検知用標準液

添加回収試験用の試料に添加する小麦タンパク質の標準品を調製するにあたって、通知法の小麦一次標準調製方法では14銘柄の小麦を混合して使用することが示されている<sup>1)</sup>。しかしながら、全ての小麦の品種を入手することが困難であったため、入手可能であった北海道産ホクシン種からタンパク質を抽出した。小麦標準品原液中の総タンパク質濃度を確認したところ、タンパク質濃度は5.8 mg/mLとなり、通知法の標準品規格として示されているタンパク質濃度(4.0-6.0 mg/mL)の範囲内であった<sup>1)</sup>。また、標準品原液についてSDS-PAGEを行い、泳動像を通知法の標準品規格で示されている泳動像と一致することを確認した<sup>1)</sup>。

#### 1.2. 落花生検知用標準液

添加回収試験用の試料に添加する落花生タンパク質の標準品を調製するにあたって、通知法の落花生標準品規格では千葉県産バージニア種の落花生を使用することが示されている<sup>1)</sup>。このため、バージニア種として国内で流通している千葉県産千葉半立種の生落花生を入手し、タンパク質を抽出した。落花生標準品原液中の総タンパク質濃度を確認したところ、タンパク質濃度は3.4 mg/mLとなり、通知法の標準品規格として示されているタンパク質濃度(3.4 - 4.3 mg/mL)の範囲内であった<sup>1)</sup>。また、落花生標準品原液についてSDS-PAGEを行い、泳動像を通知法の標準品規格で示されている泳動像と一致することを確認した<sup>1)</sup>。

## 2. 測定阻害因子の評価

### 2.1. ELISAへの測定阻害の評価

#### 2.1.1. 夾雑物による小麦ELISAキットへの影響

##### 2.1.1.1. カカオによる測定阻害

図1に示すようにFASPEKの回収率は34-57%となり、カカオ中の夾雑物による顕著な阻害が確認された。一方で、FASTKITの回収率は90-125%となり、試料抽出液中の夾雑物による測定の阻害は確認されなかった。小麦の特定のタンパク質を測定対象としているFASPEKはカカオ由来の夾雑物からの影響を受けやすかったと考えられる。

##### 2.1.1.2. シナモンによる測定阻害

図2に示すようにFASPEKの回収率は14-63%となり、シナモン中の夾雑物による顕著な阻害が確認された。一方で、FASTKITの回収率は53-94%となり、FASPEKと比較して測定阻害は受けにくかった。カカオによる測定阻害と同様に、特定のタンパク質を対象としているFASPEKはシナモン由来の夾雑物からの影響を受けやすかったと考えられる。

#### 2.1.2. 夾雑物による落花生ELISAキットへの影響

##### 2.1.2.1. カカオによる測定阻害

図3に示すように、FASPEKの回収率は92-118%となり、カカオ中の夾雑物による阻害は確認されなかった。一方で、FASTKITの回収率は29-55%となり、複数のタンパク質を対象とするFASTKITでカカオ中の夾雑物による測定阻害の影響を受けやすかった。このことから、FASTKIT

のみで測定対象となるタンパク質がカカオ中の夾雑物からの影響を特異的に受けたと推察される。

##### 2.1.2.2. シナモンによる測定阻害

図4に示すようにFASPEKの回収率は60-101%となり、シナモン中の夾雑物による阻害は確認されなかった。一方で、FASTKITの回収率は25-87%となり、複数のタンパク質を対象とするFASTKITでシナモン中の夾雑物からの影響を受けやすかった。FASTKITのみで対象となるタンパク質がシナモン中の夾雑物から影響を特異的に受けたと推察される。

## 2.2. 添加回収試験

### 2.2.1. 小麦

#### 2.2.1.1. カカオを含む食品からの添加回収試験

図5のControlに示すように、FASPEKの回収率は9-27%、FASTKITの回収率は13-40%となり、両キットで回収率は50%未満となった。カカオパウダーからの抽出効率は、これまでにEUの小麦の標準物質であるPWG-Gliadinをカカオパウダーに添加して評価した場合と同様に十分な回収が得られなかった<sup>4</sup>。

#### 2.2.1.2. シナモンからの添加回収試験

図6のControlに示すように、FASPEKではシナモンに添加した小麦は全く回収されなかった。複数タンパク質を対象とするFASTKITでも回収率は0-25%となり、両キットで回収率は50%未満となった。カカオパウダーと比較して、シナモンパウダーからの回収は困難であった。

## 2.2.2. 落花生

### 2.2.2.1. カカオを含む食品からの添加回収試験

図7のControlに示すように、FASPEKの回収率は51-83 %となり、カカオを含む食品からの回収率は評価基準を満たしていた。一方で、FASTKITの回収率は15-47 %となり、カカオからの回収率は50 %未満となった。

### 2.2.2.2. シナモンからの添加回収試験

図8のControlに示すように、FASPEKの回収率は0-17 %となり、シナモンパウダーから落花生の抽出は困難であった。また、FASTKITの回収率は0-21 %となり、複数のタンパク質を対象とするFASTKITについてもシナモンパウダーから落花生の抽出は困難であった。

## 3. 抽出法の改良

### 3.1. PVPによる抽出条件の最適化

EUでの小麦の標準物質PWG-Gliadinをカカオパウダーに添加して評価した場合には、重合度の最も小さいPVP K15によって小麦の回収率の回復に対する効果が最も高いことがこれまでに確認されている<sup>3,4</sup>。

このため、落花生の添加回収試験についても重合度の異なるPVPを抽出液に添加して評価した。試料1のカカオパウダーに落花生の標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、重合度の異なるPVPを1 % (w/v) 抽出液に添加して抽出を行った。図9に示すように、落花生の測定でも、小麦で評価した場合と同様に重合度の最も小さいPVP K15によって回収率の改善に対する効果が

最も高かった<sup>4</sup>。次に、PVP K15の抽出液への添加濃度について評価を行った結果、添加濃度が1 % (w/v)の時に落花生の回収率が最も高かった。

最適化したPVP K15を1 % (w/v) 添加した抽出液でカカオを含む食品10試料について添加回収試験による評価を行った結果、全ての試料でPVPを添加した際にFASPEKとFASTKITの回収率の回復が確認された (図5：小麦、図7：落花生)。

### 3.2. ゼラチンによる抽出条件の最適化

試料2のシナモンパウダーに落花生の標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、PVP K15を1 % (w/v) 抽出液に添加して抽出を行った際には十分に回収率が得られなかった。過去の報告では、シナモンからの抽出効率の改善にはCold water fish skin由来のGelatinが有効であることが報告されている<sup>2</sup>。このため、Cold water fish skin由来のGelatinを10 % (w/v) 添加した抽出液によって、シナモンを含む食品13試料の添加回収試験による評価を行った。その結果、図6に示すように小麦の測定ではFASPEKとFASTKITの回収率の改善が確認された。しかしながら、落花生の測定では、50 %の回収率を満たさない試料も確認され、一部のシナモンパウダー (図8：試料8、12) では回収率は改善されなかった。このため、今後も精度管理用試料の調製法や抽出条件について検討する必要がある。

## E. 結論

今年度は特定原材料 (小麦・落花生) の定量について、PACを含むカカオとシナモンによる定量への影響について評価を行っ

た。カカオとシナモンによる測定阻害は各キットが測定対象とするタンパク質によって差異が確認された。添加回収試験で回収率の低下が確認された試料について、カカオはPVPを抽出液に添加することによって回収率の上昇が確認された。また、シナモンはCold water fish skin由来のGelatinを抽出液に添加することによって、回収率の上昇が確認された。シナモンについては精度管理用試料の調製法や抽出条件について引き続き検討を行う必要がある。最終的には、改良した検査法を複数機関による室間共同試験で評価することができれば、改良法の適切な科学的根拠を示すことに繋がる。

成27年3月30日消食表第139号、別添 アレルゲン関係)による

2) 渡辺卓穂、安達玲子、鈴木達也、梅津麻実、佐藤夏岐. 平成26年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業) 報告書 149-163, 2014

3) 村上太郎. 平成26年度 科学研究費助成事業2016 年度 研究成果報告書, 2016

4) Taro Satsuki-Murakami, Ayuko Kudo, Atsushi Masayama, Masami Ki, Tetsuo Yamano. *Food Control* 84, 70–74, 2018

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 引用文献

1) 消費者庁「食品表示基準について」(平

以下 図表

表1 カカオを含む試料

	試料	生産国
1	ココアパウダー	オランダ
2	ココアパウダー	オランダ
3	ココアパウダー	マレーシア
4	ココアパウダー	マレーシア
5	ココアパウダー	フランス
6	ローストカカオ豆	タイ
7	ローストカカオ豆	エクアドル
8	ローストカカオ豆	インドネシア
9	カカオニブ	トーゴ
10	カカオニブ	コロンビア

表2 シナモンを含む試料

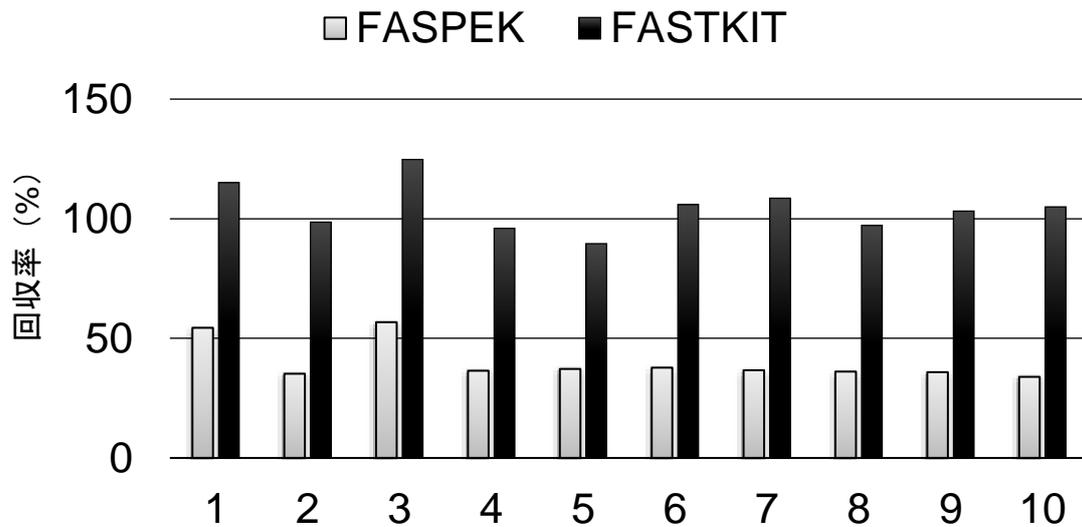
	試料	生産国
1	シナモンパウダー	スリランカ
2	シナモンパウダー	スリランカ
3	シナモンパウダー	スリランカ
4	シナモンパウダー	スリランカ
5	シナモンパウダー	ベトナム
6	シナモンパウダー	ベトナム
7	シナモンパウダー	ベトナム
8	シナモンパウダー	マレーシア
9	シナモンパウダー	マレーシア
10	シナモンパウダー	中国
11	シナモンパウダー	中国
12	シナモンパウダー	インド
13	シナモンパウダー	マダガスカル

表3 Polyvinylpyrrolidone関連試薬

試薬	略称	入手先	分子量 <sup>*1</sup>
N-Vinyl pyrrolidone	NVP	東京化成工業	111
Polyvinylpyrrolidone K 15	PVP K15	東京化成工業	10000
Polyvinylpyrrolidone K 25	PVP K25	富士フィルム和光純薬	24000
Polyvinylpyrrolidone K 30	PVP K30	東京化成工業	40000
Polyvinylpyrrolidone K 60	PVP K60	Merck	160000
Polyvinylpyrrolidone K 90	PVP K90	東京化成工業	360000
Polyvinylpolypyrrolidone	PVPP	Merck	NA <sup>*2</sup>

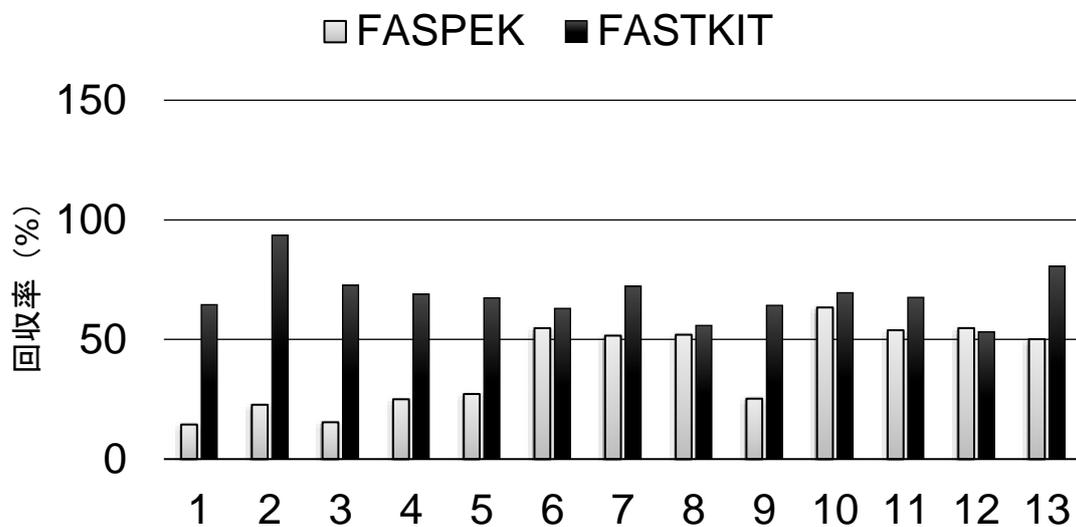
\*1 PVPは重量平均分子量を記載

\*2 PVPPは不溶性のポリマーのため、算出不能



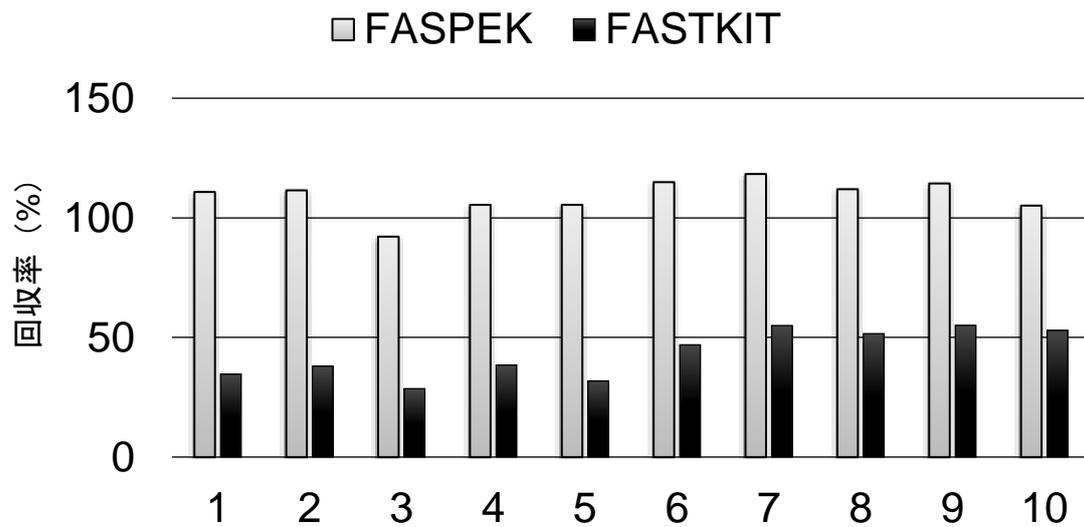
**図1 カカオによる小麦の測定への影響**

希釈後の試料抽出液に各キットの標準溶液を6.25 ng/mLとなるように添加して測定



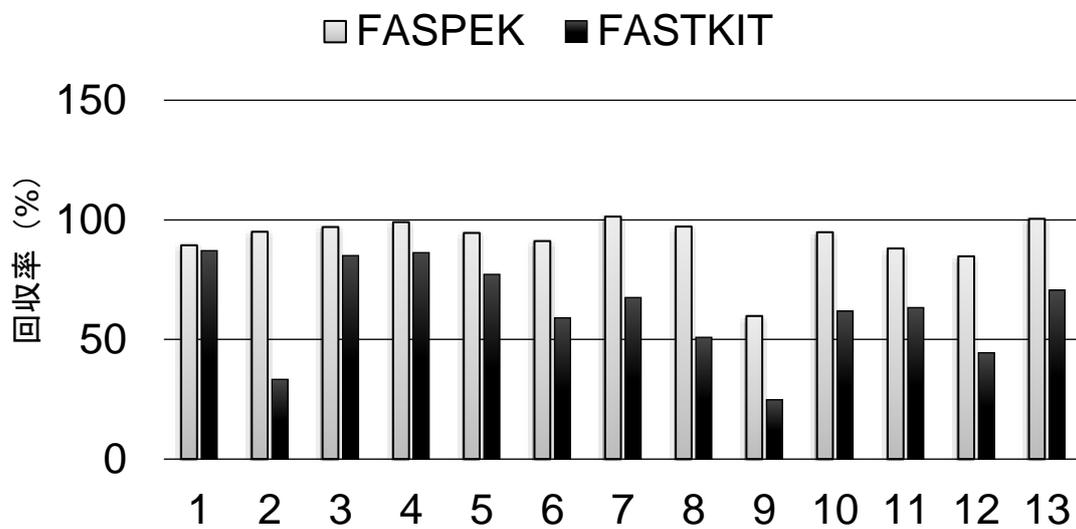
**図2 シナモンによる小麦の測定への影響**

希釈した試料抽出液に各キットの標準溶液を6.25 ng/mLとなるように添加して測定



**図3 カカオによる落花生の測定への影響**

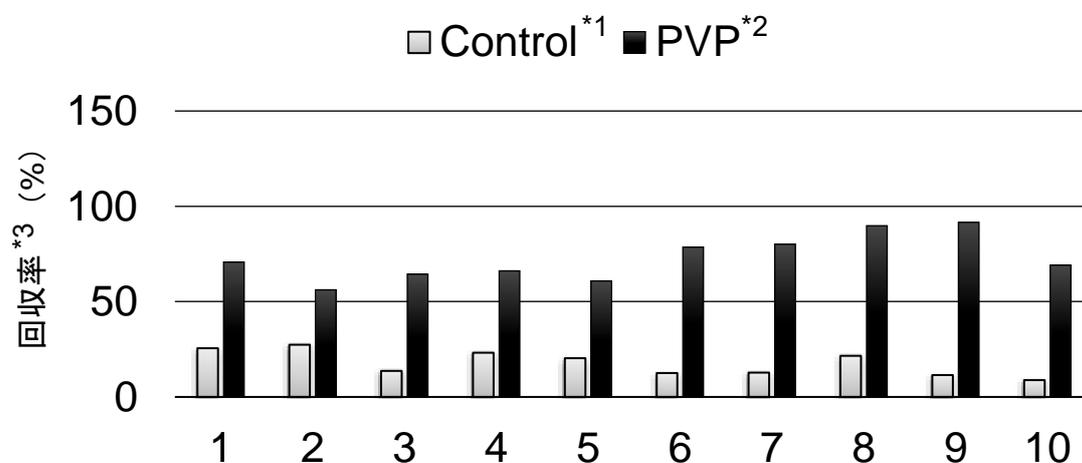
希釈後の試料抽出液に各キットの標準溶液を6.25 ng/mLとなるように添加して測定



**図4 シナモンによる落花生の測定への影響**

希釈後の試料抽出液に各キットの標準溶液を6.25 ng/mLとなるように添加して測定

## FASPEK



## FASTKIT

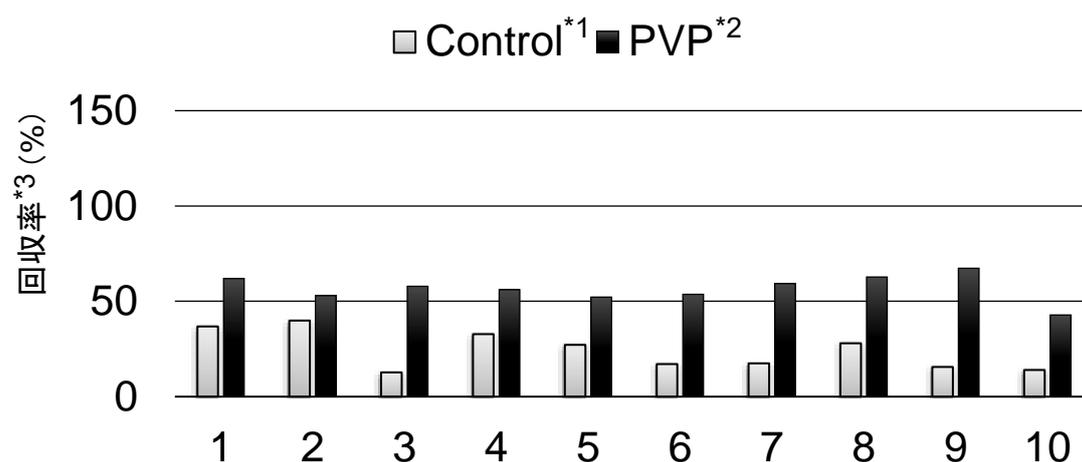


図5 カカオを含む食品からの小麦の添加回収試験

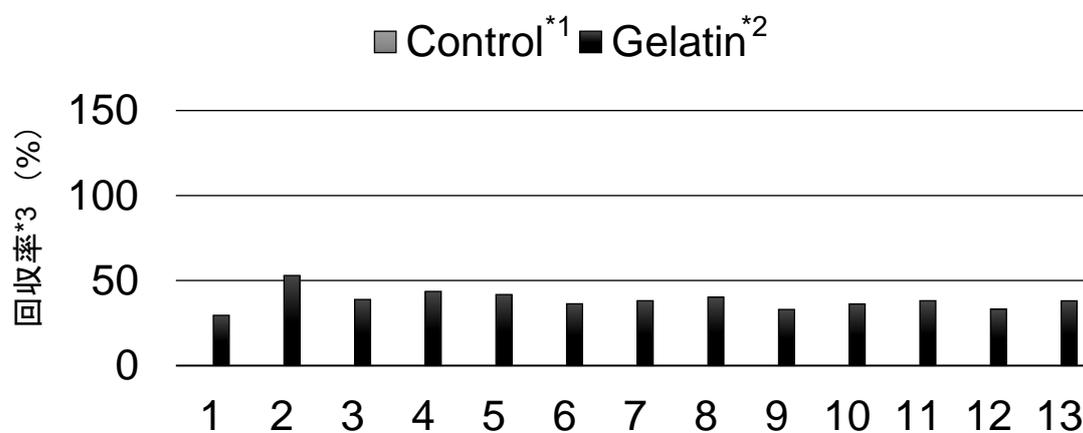
各試料に標準溶液をタンパク質濃度として5 µg/gとなるように添加して抽出

\*1 キットの抽出液によって抽出

\*2 抽出液にPVPを1% (w/v)添加して抽出

\*3 併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率

## FASPEK



## FASTKIT

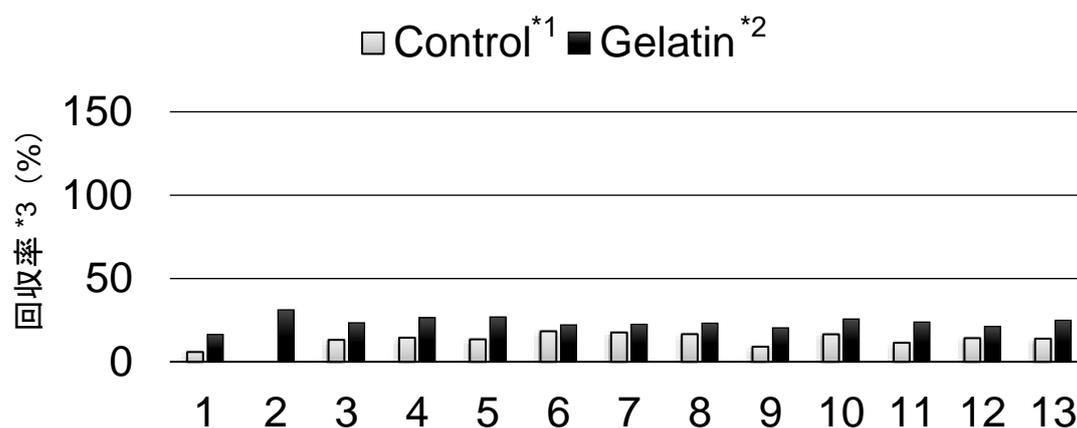
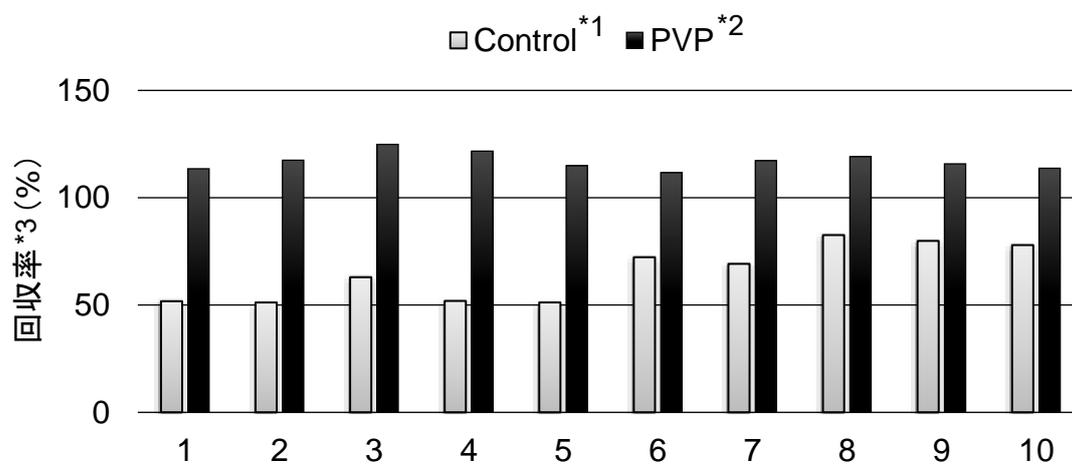


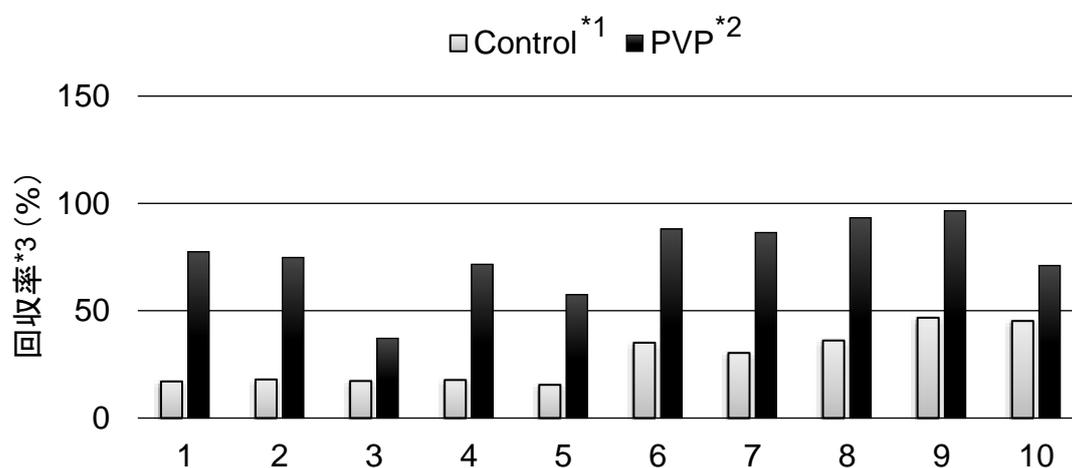
図6 シナモンを含む食品からの小麦の添加回収試験

- \*1 キットの抽出液によって抽出
- \*2 抽出液にGelatin を10 % (w/v)添加して抽出
- \*3 併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率

## FASPEK



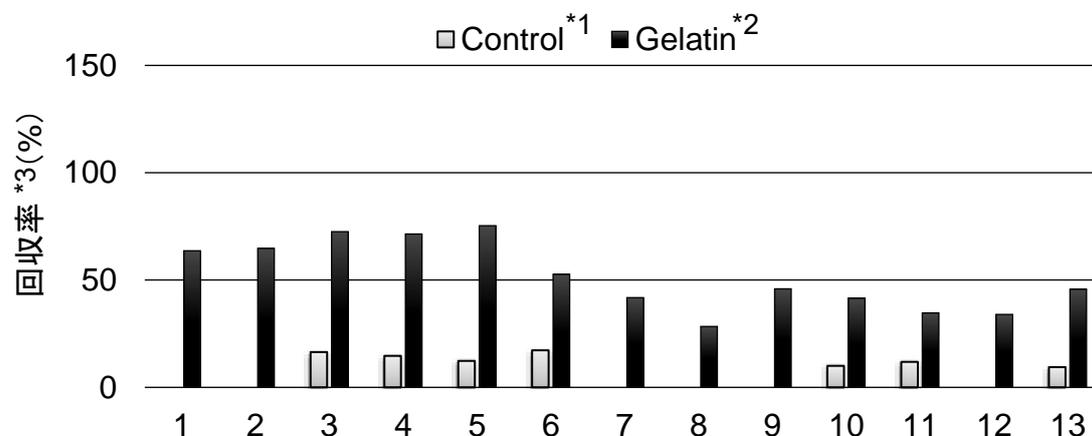
## FASTKIT



**図7 カカオを含む食品からの落花生の添加回収試験**

- \*1 キットの抽出液によって抽出
- \*2 抽出液にPVPを1% (w/v)添加して抽出
- \*3 併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率

## FASPEK



## FASTKIT

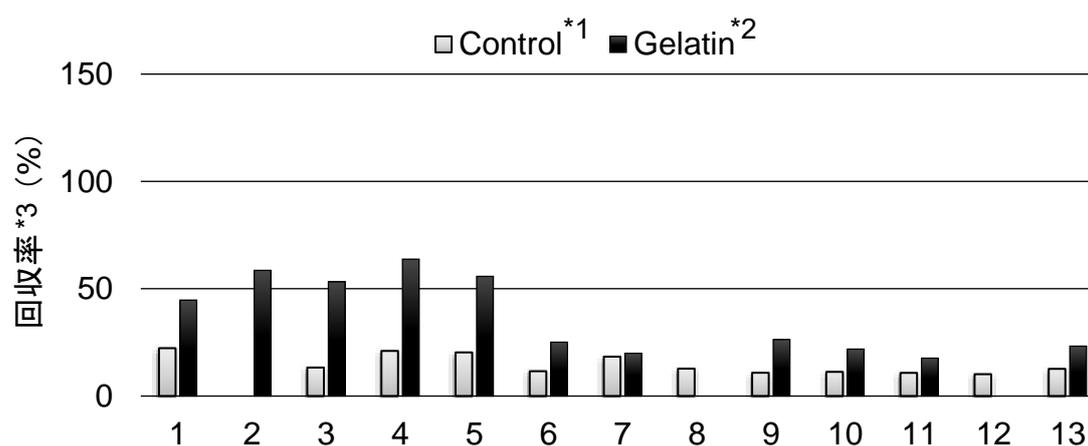
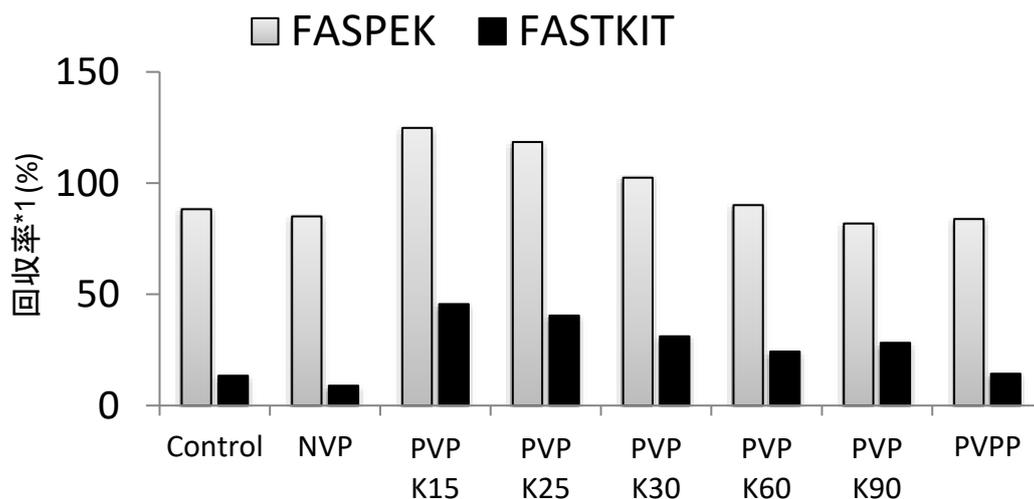


図8 シナモンを含む食品からの落花生の添加回収試験

- \*1 キットの抽出液によって抽出
- \*2 抽出液にGelatinを10% (w/v)添加して抽出
- \*3 併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率



## 図9 Polyvinylpyrrolidone関連試薬の添加によるカカオからの落花生の添加回収試験

カカオに落花生規格標準品を5 µg/g添加し、各化合物を1 % (w/v)含む抽出液で抽出後にFASPEK とFASTKIT によって測定

Control : 通常の抽出液、NVP : 1-vinyl-2-pyrrolidone、PVP: Polyvinylpyrrolidone, PVPP: Polyvinylpolypyrrolidone

\*1 併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究

研究代表者 渡辺 卓穂 （一財）食品薬品安全センター秦野研究所 部長  
研究分担者 鎗田 孝 茨城大学農学部 准教授  
研究協力者

### 研究要旨

食品に関わる検査機関では、得られる分析値の信頼性を確保するために、分析の精度管理が必須である。技能試験は精度管理手法の一つであり、Codex CAC/GL 27 の要求事項であるほか、ISO/IEC 17025 では試験結果の妥当性を確保する手順の一つに挙げられている。

下痢性貝毒は下痢、吐気、嘔吐、腹痛などの症状をともなう食中毒の一種であり、オカダ酸（OA）、ジノフィシストキシン-1（DTX1）、ジノフィシストキシン-2（DTX2）、これらのエステル誘導体（DTX3）を毒素とする。わが国では、その検査法として、2015年3月に液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（LC-MS/MS）による機器分析法が導入された。しかしながら、下痢性貝毒検査に関する技能試験については、現在のところ定常的に実施されている技能試験はなく、同検査検査の信頼性を確保するうえでの問題点となっていた。

そこで、本研究において、下痢性貝毒検査に関する外部精度管理調査のパイロットスタディを実施することにした。3年計画の初年度である令和2年度は、検査用試料の調製法を検討するとともに、OA群のLC-MS/MS測定を正確に行うための傷害となっているマトリックス効果の影響を検証した。

検査用試料の調製法については、ホタテガイ可食部と中腸腺を均質化および混合したもの5gずつ瓶詰することにより、検査用試料123本を調製した。一方、マトリックス効果の影響評価においては、中腸腺試料の分析において、明らかなマトリックス効果の影響を確認した。一方で、可食部を主とする試料の分析においては、マトリックス効果の影響よりもLC-MS/MSの測定精度が、正確な分析を行う上での阻害要因と考えられた。そのため、LC-MS/MS法以外の正確な分析技術の開発が必要と考えられた。

### A. 研究目的

れた二枚貝をヒトが摂取することにより  
下痢性貝毒は、有毒渦鞭毛藻で汚染さ 下痢、吐気、嘔吐、腹痛などの症状が引

き起こされる食中毒である。主な毒素は、オカダ酸 (OA)、ジノフィシストキシン-1 (DTX1)、ジノフィシストキシン-2 (DTX2)、これらのエステル誘導体 (DTX3) である (以下、これらをOA群と総称する)。

わが国では、下痢性貝毒の検査にマウス毒性試験適用されてきた。しかし、この方法には実験動物を使用することに対する倫理的な懸念があり、また、OA群に対する選択性や感度の低さなどの欠点があった。このような背景のもと、2015年3月に下痢性貝毒の公定検査法として液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) による機器分析法が導入された。これと同時に規制値も変更され、それまでの可食部1 gあたりの毒量が0.05 MU (マウスユニット) であった規制値が、可食部につき0.16 mg OA/kgに変更された。

食品分析で得られる分析値は、分析方法や分析装置など様々な要因によって正しい値から偏ってしまう。そのため、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。さらに、食品の輸出が促進され、輸入量も増加している状況に鑑みれば、食品分析によって規制値の誤判定を回避することは、輸出入国間での係争を回避するためにも重要といえる。

分析精度の管理手法の一つに技能試験がある。CodexのCAC/GL 27 (食品の輸出入規制にかかわる試験所の能力評価に関するガイドライン) における要求事項として適切な技能試験プログラムへの参加が挙げられている。また、ISO/IEC 17025 (試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項) においても、試験結果の妥当性を確保する手順の一つとして、技能

試験を含む試験所間比較への参加などが挙げられている。わが国では、外部精度管理調査プログラムにおいて、残留農薬、食品添加物、重金属等の技能試験が行われている。これに対し、下痢性貝毒検査については、現在のところ定常的に実施されている技能試験はなく、下痢性貝毒検査の信頼性を確保するうえでの問題点となっていた。

そこで、本研究において、下痢性貝毒検査に関する外部精度管理調査パイロットスタディを実施することにした。3年計画の初年度である令和2年度は、検査用試料の調製法を検討した。さらに、調製した検査用試料を評価するためにはLC-MS/MSによる正確な分析が不可欠であることから、これを妨害すると考えられるマトリックス効果の影響を検証した。

## B. 方法

### 1. 検査用試料の調製と評価

#### (1) 材料・試薬

検査用試料の調製には、ホタテガイ可食部 (国内産) と、OAおよびDTX1の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料 (均質化済み) を用いた。

1 µg/mL OA溶液と1 µg/mL DTX1溶液 (いずれも溶媒はメタノール) は産業技術総合研究所から入手した。LC-MS用アセトニトリルおよびギ酸、高速液体クロマトグラフィー用メタノール、試薬特級 *n*-ヘキサン、水酸化ナトリウム、塩酸は富士フィルム和光純薬から入手した。LC-MS用ギ酸アンモニウムはSigma Aldrichから入手した。

## (2) 調製方法

ホタテガイの可食部をブレンダーで細断し、裏ごし器（2 mm）で裏ごしを行った。得られた試料をポリ製広口瓶に入れ、スプーンで混ぜた。このポリ製広口瓶をポットミル機で約1時間30分回転混合させた。

9個のガラス瓶を用意し、1個のガラス瓶につきOAおよびDTX1の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料10 gを入れた。それぞれのガラス瓶に中腸腺の9倍量のホタテガイ可食部を加えた。それぞれのガラス瓶の内容物を葉さじで混ぜ合わせた後、1つのポリ製広口瓶にあわせ、混合した。このポリ製広口瓶をポットミル機で約1時間回転混合させた。

回転混合させた試料をおおよそ5等分に分け、それぞれをガラス瓶に入れた。その後、各ガラス瓶の内容物をポリ製遠沈管23～25本に5gずつ小分けした。

## (3) 分析方法

### a. 前処理

調製した検査用試料中のOAとDTX1の測定は、食安基発0306第4号・食安監発0306第2号「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」別紙2の「オカダ酸群分析操作例」に準拠して行った。

50 mL遠沈管に試料2 gを量りとり、メタノールを9 mL加えてホモジナイズした後、3000 rpmで10分間遠心分離し上清をとった。残さに90 %メタノール9 mLを加えて再度ホモジナイズした後、3000 rpmで10分間遠心分離した。この上清を前述の上清と合わせ、90 %メタノールを加えて正確に20 mLとした。この抽出液の2 mLをねじ

口試験管にとり、2.5 mol/L水酸化ナトリウム0.25 mLを加えて76 °Cで40分間加水分解した。放冷後、2.5 mol/L塩酸0.25 mLを加えて中和した。加水分解抽出液全量を*n*-ヘキサン2.5 mLずつで2回洗浄し、次に示す固相抽出を行った。カートリッジとしてオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（GL Sciences製InertSep C18 200 mg、リバーザー容量：3 mL）を使用した。このミニカラムにメタノール（3 mL）と水（3 mL）を順次通してコンディショニングした後、ヘキサン洗浄液を注入した。さらに、ヘキサン洗浄液が入っていたバイアル内壁を40 %メタノール（2 mL）で2回洗い込み、この液もミニカラムに注入し、流出液は捨てた。次いで、90 %メタノール（5 mL）を注入し、溶出液を15 mL遠沈管にとり、メタノールを加えて5 mLとした。

### b. LC-MS/MS測定

LC-MS/MS測定には、島津製作所のUFLC高速液体クロマトグラフ（ポンプ：LC-20AD、デガッサー：DGU-20A3、オートサンプラー：SIL-20AHT、カラムオーブン：CTO-20AC、システムコントローラ：CBM-20A）と、質量分析計（Applied Biosystems 3200 Q TRAP）を用いた。カラムはCadenza CD-C18カラム（内径：2 mm、長さ：100 mm、粒子径：3 μm）を用いた。LC-MS/MSの測定条件を表1に示す。

## 2. マトリックス効果の影響評価

### (1) 材料・試薬

マトリックスとして、1.において検査用試料の原料に用いたホタテガイ可食部（国内産）と、産業技術総合研究所が

2015年に主催した試験所間比較試験における試験試料であるホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた。

1 µg/mL溶液と1 µg/mLDTX1溶液（いずれも溶媒はメタノール）は産業技術総合研究所から入手した。LC-MS用アセトニトリルおよびギ酸、高速液体クロマトグラフィー用メタノール、試薬特級n-ヘキサン、水酸化ナトリウム、塩酸は富士フィルム和光純薬から入手した。LC-MS用ギ酸アンモニウムはSigma Aldrichから入手した。

#### (2) ホタテガイ可食部を用いた検討用試料の調製

異なる分析前処理過程によってホタテガイ可食部を処理したE液およびC液と、ホタテガイ可食部由来のマトリックスを含まないM液の3種類の検討用試料を調製した。

1 µg/mLLOA溶液と1 µg/mLDTX1溶液を混合した後にメタノールで希釈し、各30 ng/mLLOAおよびDTX1混合溶液を調製した。

E液の調製 ホタテガイ可食部2 gを1. (3)a. の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、および中和処理した。得られた溶液を2 mLになるまで窒素下で濃縮し、さらにフィルターろ過することにより処理液Eを得た。次に、各30 ng/mLLOAおよびDTX1混合溶液300 µLを窒素下で乾固し、得られた残さを処理液E600 µLに溶解した。得られた溶液を“E液”とした。

C液の調製 ホタテガイ可食部2 gを1. (3)a. の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理、ヘキサンによる洗浄、および固相抽出処理した。

得られた溶液を2 mLになるまで窒素下で濃縮し、さらにフィルターろ過することにより処理液Cを得た。次に、各30 ng/mLLOAおよびDTX1混合溶液300 µLを窒素下で乾固し、得られた残さを処理液E600 µLに溶解した。得られた溶液を“C液”とした。

M液の調製 各30 ng/mLLOAおよびDTX1混合溶液300 µLを窒素下で乾固させ、得られた残さをメタノール600 µLに溶解した。得られた溶液を“M液”とした。

#### (3) ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた検討用試料の調製

異なる分析前処理過程および濃度によってホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を処理したE1液、E液、C1液、C2液と、試験所間比較試料由来のマトリックスを含まないM1液の5種類の検討用試料を調製した。なお、各液はLOAとDTX1含有濃度が異なる5種類の溶液群から構成される。これらの試料の調製過程の概要を図1に示す。

M1液の調製 1 µg/mLLOA溶液と1 µg/mLDTX1溶液を混合した後にメタノールで希釈し、LOAを0、5、10、15、20 ng/mL、DTX1を0、16、32、48、64 ng/mL含む5種類の混合溶液を調製した。この溶液を“M1液”とした。

E1液およびE2液の調製 試験所間比較試料0.5 gを1. (3)a. の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、および中和処理した。この溶液の容量を2.5 mLに調整したものを処理液E1とした。また、処理液E1をメタノールによって4倍希釈したものを処理液E2とした。

さらに、処理液E1と処理液E2各0.5 mLを窒素下で濃縮乾固し、得られた残さをC1液(5濃度レベル)に溶解させることにより、“E1液”および“E2液”を調製した。

C1液およびC2液の調製 試験所間比較試料0.5 gを1. (3) a. の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理、ヘキサンによる洗浄、および固相抽出処理した。この溶液の容量を2.5 mLに調整したものを処理液C1とした。また、処理液C1をメタノールを用いて4倍希釈したものを処理液C2とした。

さらに、処理液C1と処理液C2各0.5 mLを窒素下で濃縮乾固し、得られた残さをM1液(5濃度レベル)に溶解させることにより、“E1液”および“E2液”を調製した。

#### (4) LC-MS/MS測定

ホタテガイ可食部を用いた検討用試料のLC-MS/MS測定には、島津製作所製液体クロマトグラフ(ポンプ: LC-20AD、デガッサー: DGU-20A3、オートサンプラー: SIL-20ACHT、カラムオープン: CTO-20AC、システムコントローラ: CBM-20A)と、質量分析計(Applied Biosystems 3200 Q TRAP)を用いた。ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた検討用試料のLC-MS/MS測定には、島津製作所製液体クロマトグラフ(ポンプ: LC-20AD、デガッサー: DGU-20A3、オートサンプラー: SIL-20ACHT、カラムオープン: CTO-20AC、システムコントローラ: CBM-20A)と、質量分析計LCMS8030を用いた。いずれにおいても、カラムはCadenza CD-C18カラム(内径: 2 mm、長さ: 100 mm、粒子径: 3 μm)を用いた。それぞれのLC-MS/MSの測

定条件は表1と同じである。

(倫理面への配慮)

研究に使用した貝毒や化学物質の取り扱い、法令を遵守し、特定の区域でのみ行った。実験廃棄物は定められた方法に従い、必要に応じて専門業者に搬出した。

### C. D. 研究結果および考察

#### 1. 検査用試料の調製と評価

##### (1) 検査試料の調製の結果

検査用試料の調製には、ホタテガイ100匹分の可食部約2.4 kg(図1(a))を用いた。これをブレンダーで細断し、試料約2.3 kgを得た。さらにこの試料を裏ごし(図1(b))、可食部に含まれる繊維質分を除去した。回収した試料量は約1.8 kgであった。この試料をポリ製広口瓶に入れて約1時間30分回転混合した。

均質化したホタテガイ可食部とホタテガイ中腸腺試料は、得られる試料中の両者の混合比が一様になるように、2段階に分けて混合した。すなわち、ホタテガイ中腸腺試料10 gを精秤し、その9倍量のホタテガイ可食部を加えて混合し(図1(c))、得られた9つの混合物をさらに混合した。これにより、両者の混合物約770 gを得た。外観上混合物の均質性に外観上の問題はないと判断された(図1(d))。

そこで、回転混合させた試料をおおよそ5等分に分け、それぞれをガラス瓶に入れた。その後、各ガラス瓶の内容物をポリ製遠沈管23~25本に5gずつ小分けした。

以上によって、検査用試料123本を調製することができた(図1(e))。この試料の

均質性は、来年度評価する予定である。

## (2) 検査用試料の分析の結果

本報告書では、検査用試料の分析結果は、調製値に対する相対値としてのみ記載している。これは、実測値を記した場合にはパイロットスタディにおいて参加機関の技能を正確に評価できなくなるためである。

本研究で使用したホタテガイ可食部を分析したところ、OAとDTX1は検出されなかった。一方で、ホタテガイ中腸腺試料中のOAとDTX1濃度は既知であることから、(1)で調製した検査用試料中のOAとDTX1の濃度（調製濃度）が算出可能である。もし調製濃度の正確さが担保できれば、パイロットスタディにおいて調製濃度を参照値とすることが可能となる。そこで、調製した検査試料中のOAホタテガイ中腸腺試料中のOAとDTX1濃度を測定し、調製値と比較した。

その結果、OAとDTX1それぞれの調製濃度を1としたときの測定結果は、1.6(OA)および1.4(DTX1)であった。分析回数が少ないため(n=2)。この結果の精確さを評価することはできないが、分析値が何らかの誤差要因を含んでいることは否定できない。文献調査の結果、下痢性貝毒検査においてはLC-MS/MS測定におけるマトリックス効果が分析値に影響を与えることが報告されていたため、これを検証する必要があると考えられた。

## 2. マトリックス効果の影響評価

### (1) ホタテガイ可食部を用いた評価結果

ホタテガイ可食部から調製した検査用

試料の分析(1. (2))において、検査用試験試料のOAとDTX1の定量結果が調製値よりも大きいことの原因として、マトリックス効果の可能性が考えられた。そこで、これを検証するためにM試料、E試料、C試料のLC-MS/MS測定を行った。これらの試料中のOAとDTX1濃度は、OA群の規制値である0.16 mg/kgの可食部試料から調製される試料溶液の濃度（16 ng/mL）相当となるように調整した。

LC-MS/MS測定における経時的な感度変化などによる影響を除外するために、3種類の試料の測定順はランダムとして、各試料について合計10回ずつ分析した。M液中のOAおよびDTX1の面積を1とした場合の相対値として、得られた結果を表2にまとめる。OAについては、E液およびC液の測定感度はM液の測定感度よりも高かった。一方、DTX1については、E液およびC液の測定感度はM液の測定感度よりも低く、1. (2)の結果とは反対の傾向を示した。しかしながら、M液とE液の測定結果およびM液とC液の測定結果のt検定を行ったところ、OAとDTX1の感度に有意な差は見られなかった（有意水準：0.05）。また、E液とC液の測定結果の比較においては、OAとDTX1の両方とも測定感度に大きな違いはみられず、少なくとも測定感度に関してはヘキサン洗浄および固相抽出処理の明確な効果はみられなかった。ただし、いずれの測定結果においても、測定の再現精度は10%以上（相対値）であり、測定の際のばらつきが、試料間のマトリックス効果の違いよりも大きかったことは否定できない。そのため、LC-MS/MSと相補的に使用

可能な測定法の開発が必要と考えられる。本研究においては、来年度に蛍光検出法を利用した HPLC 法を検討する予定である。

## (2) ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試験を用いた評価結果

ホタテガイ中の下痢性貝毒検査では、可食部ではなく中腸腺を分析することにより、OA 群が基準値以下であるかを判定することも可能である。この方法は、OA 群が中腸腺に濃縮されることを利用したものである。分析操作においては、抽出および加水分解後の精製操作を省略し、希釈のみを行うことにより LC-MS/MS 測定が可能になる利点がある。しかし、この分析方法においても LC-MS/MS 測定におけるマトリックス効果が測定結果に影響しうると考えられた。そこで、中腸腺から調製した試験所間比較試験料をマトリックスとして、検証を行った。

試験所間比較試験料には OA と DTX1 が含まれていることから、(1)のアプローチとは異なり、既知量の OA と DTX1 を添加した検討溶液の LC-MS/MS 測定の結果から関係線を作成し、その傾きを用いて検証することにした。検討の結果、得られた関係線を図 3 に、また、関係線の傾きの回帰結果を表 3 に示す。各直線の切片が異なるのは、試験所間比較試験料そのものに OA と DTX1 が含まれるためである。一方、これら OA と DTX1 は、関係線の傾きには影響しない。すなわち、傾きの違いはマトリックス効果の影響を示唆している。本測定条件においては、中腸腺マトリックスによって LC-MS/MS の感度

(すなわちイオン化の効率)が高くなるエンハンスメントが確認された。また、固相抽出処理をした場合ほど、および、希釈倍率が高いほど、マトリックス効果の影響は小さくなった。しかし、いずれの関係線の傾きについても、試験所間比較試験料由来のマトリックスを含まない M1 液の関係線の傾きとは、有意な違いがみられた。

以上より、中腸腺試験料中の OA と DTX1 を正確に測定するためには、マトリックス効果の影響を除外する必要がある。その方法としては、更なる精製過程の追加、検量線標準のマトリックスマッチング、試料溶液の更なる希釈（より高感度な LC-MS/MS が必要）などが考えられた。

## E. 結論

本研究において、下痢性貝毒検査に関する外部精度管理調査パイロットスタディを実施することを最終目的としている。3年計画の初年度である令和2年度は、ホタテガイ可食部と中腸腺を原料とすることにより、検査用試料123本を調製することができた。また、調製した検査用試料を評価するためにはLC-MS/MSによる正確な分析が不可欠であることから、これを妨害すると考えられるマトリックス効果の影響を検証した。その結果、中腸腺試験料の分析においては、明らかなマトリックス効果の影響が確認された。一方で、可食部を主とする試料の分析においては、マトリックス効果の影響よりもLC-MS/MSの測定精度が、正確な分析を行う上での阻害要因であった。来年度、これらの問

題を克服可能な分析技術を検討する予定  
である。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

**H. 知的所有権の取得状況**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 LC-MS/MSの測定条件

移動相	A：水（2 mMギ酸アンモニウム及び50 mMギ酸含有） B：95 %アセトニトリル（2 mMギ酸アンモニウム及び50 mMギ酸含有）
グラジエント条件	B：40 % (2分) → +5 %/分 (14分) → 100 % (20分) → -60 %/分 (21分) → 40 % (25分)
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 µL
イオン化法	ESI(-)
プリカーサーイオンおよびプロダクトイオン	OA：803→255(定量用)、803→113(確認用) DTX-1：817→255(定量用)、817→113(確認用)

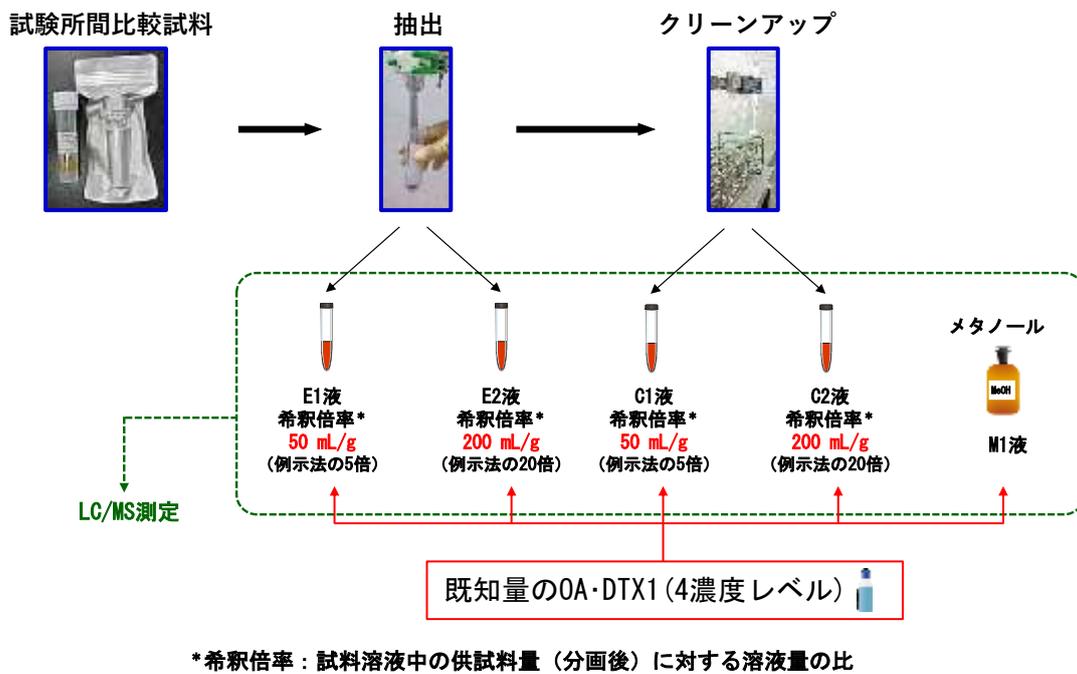


図1 ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた検討用試料の調製方法の概略



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

図2 検査用試料の調製の記録写真

- (a) 原料として用いたホタテガイ可食部
- (b) ホタテガイ可食部の均質化
- (c) 均質化したホタテガイ可食部とホタテガイ中腸腺試料の混合（右：混合前、左：混合後）
- (d) ホタテガイ可食部とホタテガイ中腸腺試料の混合によって得られた試料
- (e) 調製した検査用試料

表2 ホタテガイ可食部から調製した検討用試料のLC-MS/MS測定における  
OAとDTX1の面積

検討用試料 <sup>a)</sup>	面積 <sup>b)</sup> (平均±標準偏差)	
	OA	DTX1
E液	1.14 ± 0.13	0.93 ± 0.13
C液	1.18 ± 0.21	0.80 ± 0.11
M液	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.19

a) E液、C液、M液の詳細は本文参照

b) M液中OAおよびDTX1の平均面積を1としたときの相対値

表3 ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料から調製した検討用試料の  
LC-MS/MS測定における関係線の傾き

検討用試料 <sup>a)</sup>	面積関係線の傾き (傾き±標準誤差)	
	OA	DTX1
C1液	82.1 ± 4.5	143.9 ± 6.9
E1液	75.2 ± 2.2	140.1 ± 6.8
C2液	69.9 ± 5.2	152.3 ± 5.6
E2液	65.6 ± 2.4	135.3 ± 1.1
M1液	52.7 ± 3.7	91.2 ± 3.7

a) 各溶液の詳細は本文参照

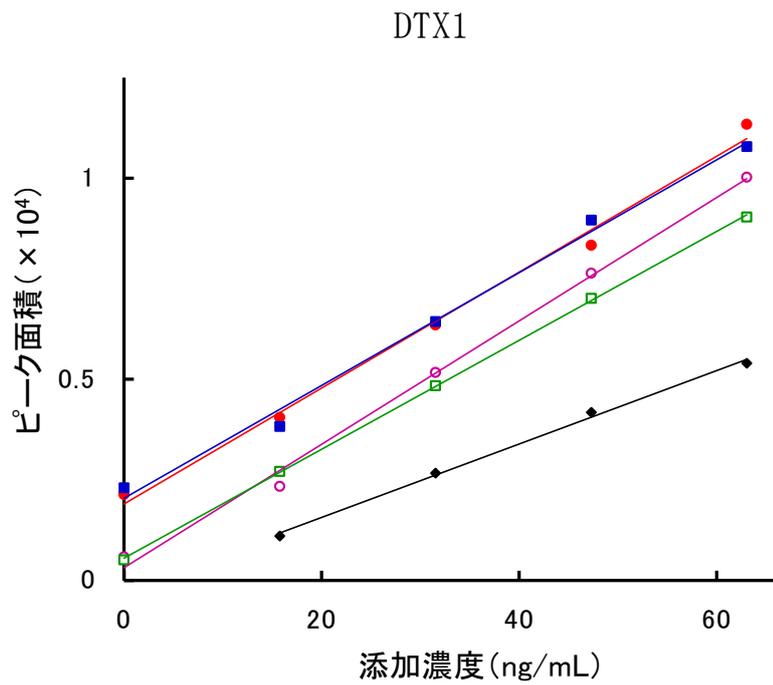
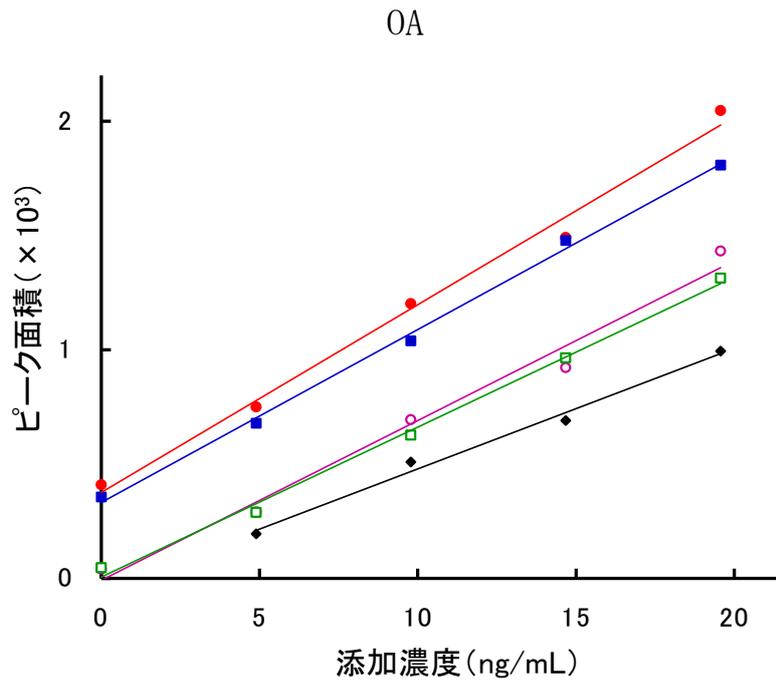


図3 ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いたマトリックス効果の影響評価  
 ● C1液、■ E1液、○ C2液、□ E2液、◆ M1液

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 部長
研究分担者	大竹 貴光	(国研) 産業技術総合研究所 主任研究員
研究協力者	中村 圭介	(国研) 産業技術総合研究所 研究員

### 研究要旨

食品の安全性を確保するためには、試験・検査等の信頼性の確保が重要であるため、食品衛生法に基づく検査機関には外部精度管理調査への参加が求められている。一方、技能試験に関する国際規格である ISO/IEC 17043 では、技能試験の付与値の不確かさをより小さくする方法として、絶対測定法による決定が挙げられている。そこで、外部精度管理調査試料中農薬の精確な分析法を確立し、同調査の信頼性をより向上させることを目的として、同位体希釈質量分析法（IDMS）の適用を検討している。

今年度は、食品薬品安全センター 秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料中のクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを対象とし、同位体希釈質量分析法（IDMS）を用いて高精度化した「平成17年1月24日付け食安発第0124001号の通知試験法（一斉試験法）」および簡易分析法の QuEChERS 法により分析値を付与した。なお本法を適用するにあたり、添加回収試験により正確さを精密に評価し、対象農薬について一斉試験法と QuEChERS 法で同等の分析値が得られることも確認した。

### A. 研究目的

食品の安全性を確保するためには、試験・検査等の信頼性の確保が重要である。そのため、食品衛生法に基づく検査機関には様々な分析精度管理が求められており、その一つとして外部精度管理調査への参加が求められている。一方、外部精度管理調査を含む多くの技能試験では、付与値として参加機関の分析結果から算出した合意値を採用し、この値を基準と

して各参加機関の技能評価を行うことが一般的である。これに対し、技能試験に関する国際規格である ISO/IEC 17043:2010 (JIS Q 17043:2011) では、付与値の不確かさをより小さくする方法として、絶対測定法による決定が挙げられている。同位体希釈質量分析法（IDMS）は、分析対象化合物の安定同位体置換化合物（標識体）を内標準に用いた定量法であり、極めて精確な（正確で精度がよい）分析

を行うことができる方法である。そこで本研究では、同調査の信頼性をより向上させることを目的として、IDMSによる食品中農薬の高信頼性分析を検討している。

今年度は、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料中のクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを対象とし、IDMSを用いて高精度化した「平成17年1月24日付け食安発第0124001号の通知試験法（一斉試験法）」および簡易分析法のQuEChERS法により正確な分析値を付与することを目的とした。また分析値を付与するにあたり、添加回収試験により正確さを精密に評価した。食品中残留農薬分析にIDMSを適用した場合でも、検量線（傾き）が試料中のマトリックスに影響されることが過去の研究で明らかとなっているため、この評価において、マトリックスマッチング法を適用したIDMSの正確さについても検討した。

## B. 研究方法

### (1) 添加回収試験による一斉試験法およびQuEChERS法の評価

対象農薬が検出下限以下であることを確認した、市場流通品のブランク玄米を粉砕したものを試料とし、そこに対象農薬であるクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンをポジティブリストの基準濃度値（クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン：0.1 mg/kg, フェニトロチオン：0.2 mg/kg）になるように添加した。本試料を、IDMSを適用した一斉試験法および

QuEChERS法によって分析を行い、得られた結果を解析して各分析法の正確さを精密に評価・比較した。

### (2) 残留農薬検査用玄米試料の分析

(1)で評価した分析法を用いて、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料（Lot 1（120℃）、2（100℃）、3（80℃）の3種、温度は噴霧温度を示す）中の対象農薬を分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

## 1. 試料基材および試薬

### (1) 試料

添加回収試験による一斉試験法およびQuEChERS法の評価には、粉砕して粉末とした市場流通品の玄米を用いた。分析により、当該玄米試料中の対象農薬は検出下限以下であることを確認した。また、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料（Lot 1（120℃）、2（100℃）、3（80℃）の3種、温度は噴霧温度を示す）も分析対象とした。

### (2) 標準品

測定対象農薬の高純度標準品として、富士フィルム和光純薬製ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン（以上TraceSure）、クロルピリホス(Traceable Reference Material)を用いた。標識体の標準品として、林純薬工業製クロルピリホス- $d_{10}$ 、フェニトロチオン- $d_6$ 、Toronto Research Chemicals製マラチオン- $d_6$ とダイアジノン- $d_{10}$ を用いた。シリジスパイク標準品としてジーエルサイ

エンス製アラクロールを用いた。

### (3) 試薬

アセトニトリル (AN)、アセトン (Ac)、トルエン (Tol)、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  は関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留農薬分析用を用いた。QuEChERS法で用いたPSA、グラファイトカーボンブラック、C18はAgilent Technologies社製のものを用いた。他の試薬は試薬グレードを用い、水は超純水を用いた。

## 2. 検量線溶液、内標準溶液、シリンジスパイク溶液

質量比混合法によって以下の溶液を調製した。

### (1) 添加回収試験による一斉試験法およびQuEChERS法の評価用

クロルピリホス- $d_{10}$ 、ダイアジノン- $d_{10}$ 、フェニトロチオン- $d_6$ 、マラチオン- $d_6$ を含むAc溶液を調製し、内標準溶液Aとした。アラクロールをAcに溶解した溶液を調製し、さらにこの一部をAcに希釈してシリンジスパイク溶液Aを調製した。一方、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンをAcに溶解させ農薬混合溶液Aを調製した。さらに、農薬混合溶液A、内標準溶液A、アラクロール溶液A、Acを混合することにより、検量線溶液Aを調製した。検量線溶液Aの各成分濃度は、3(1)および3(2)に示す前処理法によって玄米試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調製した。

次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体含有しないことを確認した玄米試料を3(1)および3(2)に示す前処理法

によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の検量線溶液Aに溶解させることにより、マトリックスマッチ検量線溶液A-1(一斉試験法用)およびA-2(QuEChERS法用)を調製した。

### (2) 残留農薬検査用玄米試料の分析用

(1)と同様に、内標準溶液B、農薬混合溶液B、アラクロール溶液B、検量線溶液B、マトリックスマッチ検量線溶液B-1(一斉試験法用)およびB-2(QuEChERS法用)を調製した。なお、検量線溶液B中の各成分濃度は、3(3)および3(4)に示す前処理法によって残留農薬検査用玄米試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調製した。

## 3. 分析方法

添加回収試験による一斉試験法の評価では分析法1を、QuEChERS法の評価では分析法2を用いて玄米中の農薬を分析し、各分析法の評価を行った。また、残留農薬検査用玄米試料中の農薬分析には分析法3,4を用いた。

### (1) 分析法1(一斉試験法、添加回収試験)

玄米試料3gに農薬混合溶液A0.4mLおよび内標準溶液A0.4mLを加えて静置した。これに水10mLを加えて15分静置した後、AN25mLを加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にAN10mLを加えて細砕した後、吸引ろ過した。これにNaCl10gと0.5mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)20mLを加え、10分間振とうした。その後、あらかじめAN10mLでコンディショニングしたAgilent Technologies製Bond Elut C18 固

相抽出カートリッジ (1 g) を用いて、振とうによって得られたAN層とAN2 mLを通液する処理を行った。得られた処理液を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/To1 (3:1) 混液 2 mLに溶解した。Supelco製ENVI-Carb/LC-NH2固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) をAN/To1 (3:1) 混液10 mLでコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらにAN/To1 (3:1) 混液20 mLを注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液A 0.5 mLに溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を、GC/MS によって測定した。測定条件は以下の通りである。装置：7890/5975c GC/MS システム (Agilent Technologies 製)、カラム：DB-5ms (30 m×0.25 mm、膜厚0.25 μm、Agilent Technologies 製)、カラム温度：50 °Cで2分間保持した後、+20 °C/分で160 °Cまで昇温し、さらに+7 °C/分で300 °Cまで昇温し、10分間保持、注入口温度：250 °C、検出器温度：230 °C (イオン源)、注入方式：スプリットレス、キャリアガス：ヘリウム、注入量：1 μL、イオン化条件：EI、定量に用いた *m/z* : 314 (クロルピリホス)、324 (クロルピリホス-*d*<sub>10</sub>)、304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン-*d*<sub>10</sub>)、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン-*d*<sub>6</sub>)、158 (マラチオン)、164 (マラチオン-*d*<sub>6</sub>)、188 (アラクロール)。

(2) 分析法 2 (QuEChERS 法、添加回収試験)

玄米試料 1 g に農薬混合溶液 A0.1 mL および内標準溶液 A0.1 mL を加えて静置

した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、AN10 mL を加えて 1 分間振とう (手振り) した。これに 4 g の MgSO<sub>4</sub>、1 g の NaCl を加え、1 分間振とう (手振り) した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液に固相剤を添加して 1 分間振とう (手振り) した。このとき固相剤として 300 mg の PSA、45 mg の グラファイトカーボンブラック、300 mg の C18、900 mg の MgSO<sub>4</sub> を加えた。再び 3500 rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を窒素により乾固した。アラクロール溶液 B の 0.2 mL を添加して、GC/MS 測定用の試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を GC/MS によって測定した。測定条件は、分析法 1 と同じである。ただし、夾雑物によってクロマトグラムピークが妨害されるため、定量に用いた *m/z* のうち、マラチオンを 285、マラチオン-*d*<sub>6</sub> を 291 とした。

(3) 分析法 3 (一斉試験法、残留農薬検査用玄米試料の分析)

残留農薬検査用玄米試料 3 g に内標準溶液 B0.4 mL を加えて静置した。これより後の工程は、分析法 1 と同様に実施した。

(4) 分析法 4 (QuEChERS 法、残留農薬検査用玄米試料の分析)

残留農薬検査用玄米試料 1 g に内標準溶液 B0.1 mL を加えて静置した。これより後の工程は、分析法 2 と同様に実施した。

#### 4. 評価方法

(1) 農薬濃度の算出

3 で示した分析方法で得られた結果を基に、以下の式によって農薬濃度を算出した。

$$C = F_e \times \frac{R_s}{R_c} \times \frac{M_c \times C_c \times P \times M_{sp(s)}}{M_s \times M_{sp(c)}} \quad (1)$$

ただし、 $C$ ：試料中の農薬濃度、 $F_e$ ：前処理の精度に関わる係数(= 1)、 $R_s$ ：試料溶液測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 $R_c$ ：検量線溶液の測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 $M_c$ ：検量線溶液中の農薬混合液の質量、 $C_c$ ：農薬混合液中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 $P$ ：分析対象農薬の高純度標準品の純度、 $M_{sp(s)}$ ：試料に添加した内標準溶液の質量、 $M_s$ ：試料量、 $M_{sp(c)}$ ：検量線溶液中の内標準溶液の質量、である。

(2) 添加回収試験による一斉試験法および QuEChERS 法の評価

式(1)に準じて一斉試験法(分析法 1)および QuEChERS 法(分析法 2)による分析値を算出した。得られた結果を、玄米試料への添加濃度(クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン：0.1 mg/kg, フェニトロチオン：0.2 mg/kg)と比較することにより、一斉試験法の正確さを評価した。なお、マトリックスマッチ検量線溶液 A-1(一斉試験法用)および A-2(QuEChERS 法用)を用いた測定結果により評価を行ったが、比較のために、検量線溶液 A を用いた測定結果も算出した。

(3) 残留農薬検査用玄米試料の分析

式(1)に準じて一斉試験法(分析法 3)および QuEChERS 法(分析法 4)による分析値を算出した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

(倫理面への配慮)

食の安全・安心に係わる研究であり、特に倫理面への配慮を必要としなかった。実験者および環境への配慮としては、特に有害な溶媒(ベンゼン等)を使用しなかった。

## C. D. 研究結果および考察

### 1. 一斉試験法の評価

分析法 1 で得られた定量値と調製値の比を表 1 に示す。この結果から、本方法によって調製値通りの分析値が得られることが示された。また各農薬の標識体の回収率も、80~86 %と良好であった。なお、マトリックスマッチングを行っていない検量線溶液 A を用いた場合の算出結果は、クロルピリホスが 104 %、ダイアジノンが 99 %、フェニトロチオンが 89 %、マラチオンが 98 %であり、マトリックスマッチ検量線溶液 A-1 との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。よって、マトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であると考えられた。

### 2. QuEChERS 法の評価

QuEChERS 法は、食品中の残留農薬一斉分析法として開発され、操作が迅速・簡便であることから、現在では食品試料のみならず、環境試料や生体試料などを対象として、世界中で使用されている。また、国内でも今後普及する可能性が高いことから、本研究においては食品中の正確な農薬分析の検討に用いた。QuEChERS 法(分析法 2)で得られた定量値と調製値の比を、表 1 に示す。この結果から、

QuEChERS 法によっても調製値通りの分析値が得られることが示された。さらに、各農薬の標識体の回収率も、71~77 %と良好であった。これより、本研究で対象とした玄米中の農薬に対して、簡易分析法にもかかわらず、QuEChERS 法によって十分に対象農薬が抽出され、正確な分析値が得られることが示された。なお一斉試験法と同様に、マトリックスマッチングしていない検量線 A を用いた場合の比も算出した。簡易法である QuEChERS 法は一斉試験法よりも精製効果が低いと考えられたため、IDMS においてもマトリックス効果の影響をより強く受ける可能性があるため、本検討はより重要となる。計算の結果、クロルピリホスが 103 %、ダイアジノンが 98 %、フェニトロチオンが 87 %、マラチオンが 103 %であり、マトリックスマッチ検量線溶液 A-2 との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。結果的には一斉試験法と大きな差は見られず、QuEChERS 法においてもマトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であるという結果が得られた。

### 3. 残留農薬検査用玄米試料の分析

食品薬品安全センター秦野研究所より提供された残留農薬検査用玄米試料の、Lot 1 (120 °C)、2 (100 °C)、3 (80 °C) (温度は噴霧温度を示す) の 3 種類に含まれる対象農薬を、一斉試験法および QuEChERS 法によって分析した。得られた結果を表 2, 3 (マトリックスマッチ検量線を使用) に、代表的なクロマトグラムを図 1, 2 に示す。これらより、クロマトグラムにおいて対象農薬のピークに夾雑

物による妨害が見られず、一斉試験法と QuEChERS 法の定量結果もよく一致していた。食品薬品安全センター秦野研究所によると、添加濃度はクロルピリホス: 0.1, ダイアジノン: 0.4, フェニトロチオン: 0.2, マラチオン: 0.2 (単位は mg/kg) であり、調製時の回収率は 20~60 %程度と予想されるということであった (農薬の種類によって回収率は異なる)。本研究で得られた結果 (表 2, 3) を用いて、調製時の回収率を計算した結果を表 4, 5 に示す。これより、一斉試験法および QuEChERS 法の分析結果が、添加濃度と調製時の回収率から予測される濃度の範囲とよく一致していたことが示された。以上より、玄米中の対象農薬について、本研究で検討した方法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。なお、回収率の詳細な考察等は、研究代表者である渡辺卓穂班の報告を参照のこと。

### E. 結論

IDMS を用いて高精度化した一斉試験法と QuEChERS 法の正確さを、添加回収試験により精密に評価し、対象農薬について両方法で同等の分析値が得られることが確認できた。このとき、マトリックスマッチ検量線を用いることが適切であることも示された。これらの分析法によって、食品薬品安全センター秦野研究所が調製した玄米試料中農薬に正確な分析値を付与することができた。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 大竹貴光、飯島和昭：農薬残留分析における精度管理～技能試験と認証標準物質の活用および不確かさの導入～、第43回日本農薬学会農薬残留分析研究会、Web開催、2020

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表1 一斉試験法およびQuEChERS法による添加回収試験の結果

対象農薬	調製値に対する分析値の比 (平均値±標準偏差, n=4, %)	
	一斉試験法	QuEChERS 法
クロルピリホス	102±0.1	99±0.4
ダイアジノン	100±0.4	100±0.3
フェニトロチオン	97±0.7	99±0.3
マラチオン	103±0.7	101±1.4

表2 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の農薬濃度 (平均値±標準偏差, n=3, mg/kg)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	0.063 ± 0.003	0.062 ± 0.003	0.063 ± 0.002
ダイアジノン	0.137 ± 0.005	0.128 ± 0.007	0.167 ± 0.006
フェニトロチオン	0.105 ± 0.003	0.090 ± 0.003	0.111 ± 0.005
マラチオン	0.081 ± 0.003	0.068 ± 0.001	0.084 ± 0.0003

表3 QuEChERS法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の農薬濃度 (平均値±標準偏差, n=3, mg/kg)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	0.063 ± 0.0004	0.062 ± 0.002	0.061 ± 0.004
ダイアジノン	0.135 ± 0.004	0.120 ± 0.005	0.162 ± 0.008
フェニトロチオン	0.105 ± 0.002	0.086 ± 0.002	0.105 ± 0.003
マラチオン	0.085 ± 0.001	0.067 ± 0.001	0.084 ± 0.004

表4 一斉試験法の分析結果を基にした試料調製時の回収率 (平均値±標準偏差, n=3, %)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	63.2 ± 2.8	61.9 ± 1.7	62.9 ± 1.5
ダイアジノン	34.2 ± 1.2	32.0 ± 2.2	41.7 ± 2.6
フェニトロチオン	52.7 ± 1.6	44.9 ± 1.2	55.6 ± 2.7
マラチオン	40.6 ± 1.4	33.9 ± 0.3	41.9 ± 0.1

表5 QuEChERS法の分析結果を基にした試料調製時の回収率 (平均値±標準偏差, n=3, %)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	63.3 ± 0.4	61.9 ± 1.1	60.5 ± 2.4
ダイアジノン	33.7 ± 1.1	30.1 ± 1.3	40.5 ± 3.2
フェニトロチオン	52.7 ± 1.2	42.8 ± 0.9	52.3 ± 1.7
マラチオン	42.3 ± 0.4	33.4 ± 0.3	42.0 ± 1.7

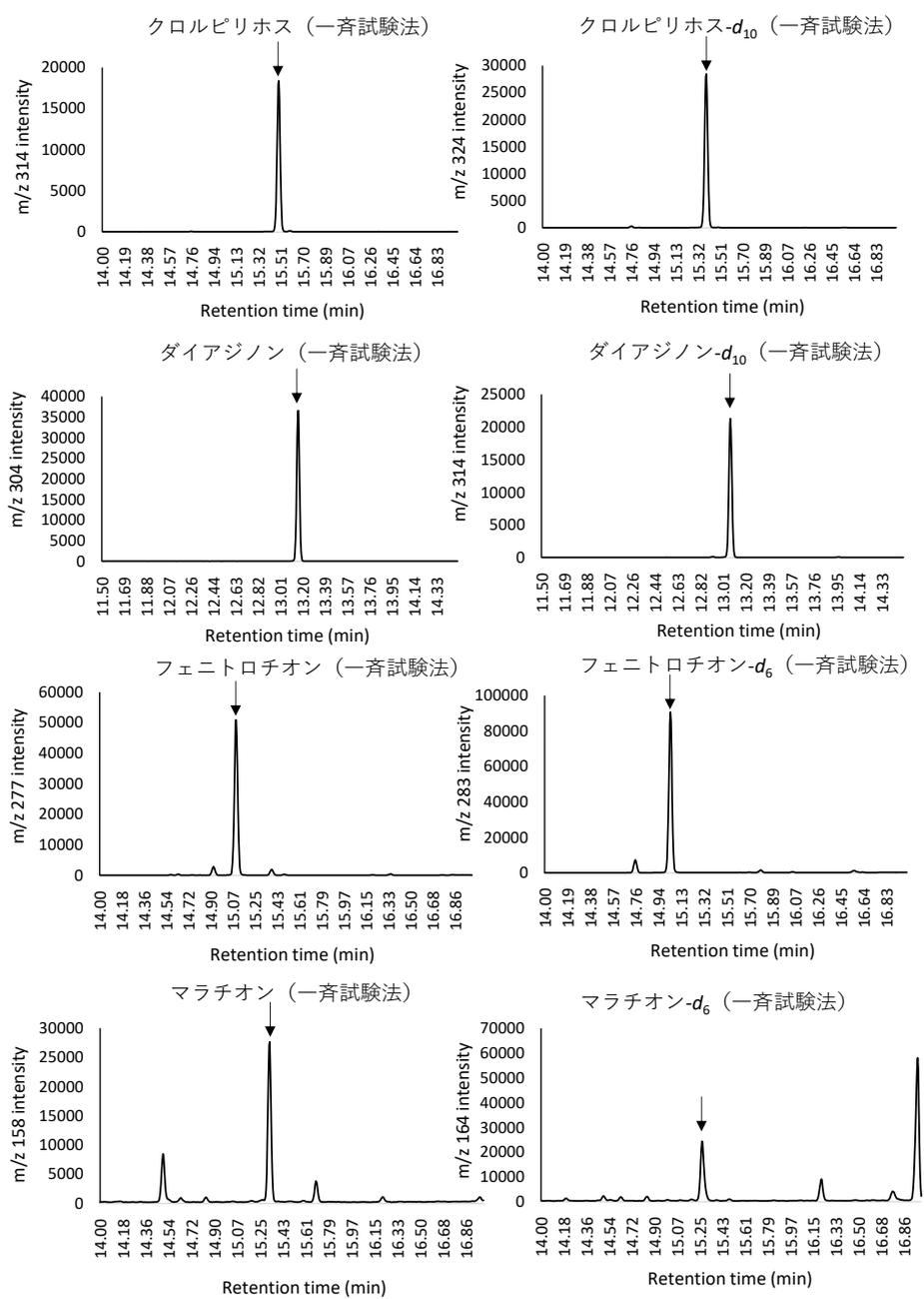


図1 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の対象農薬のGC/MSクロマトグラム

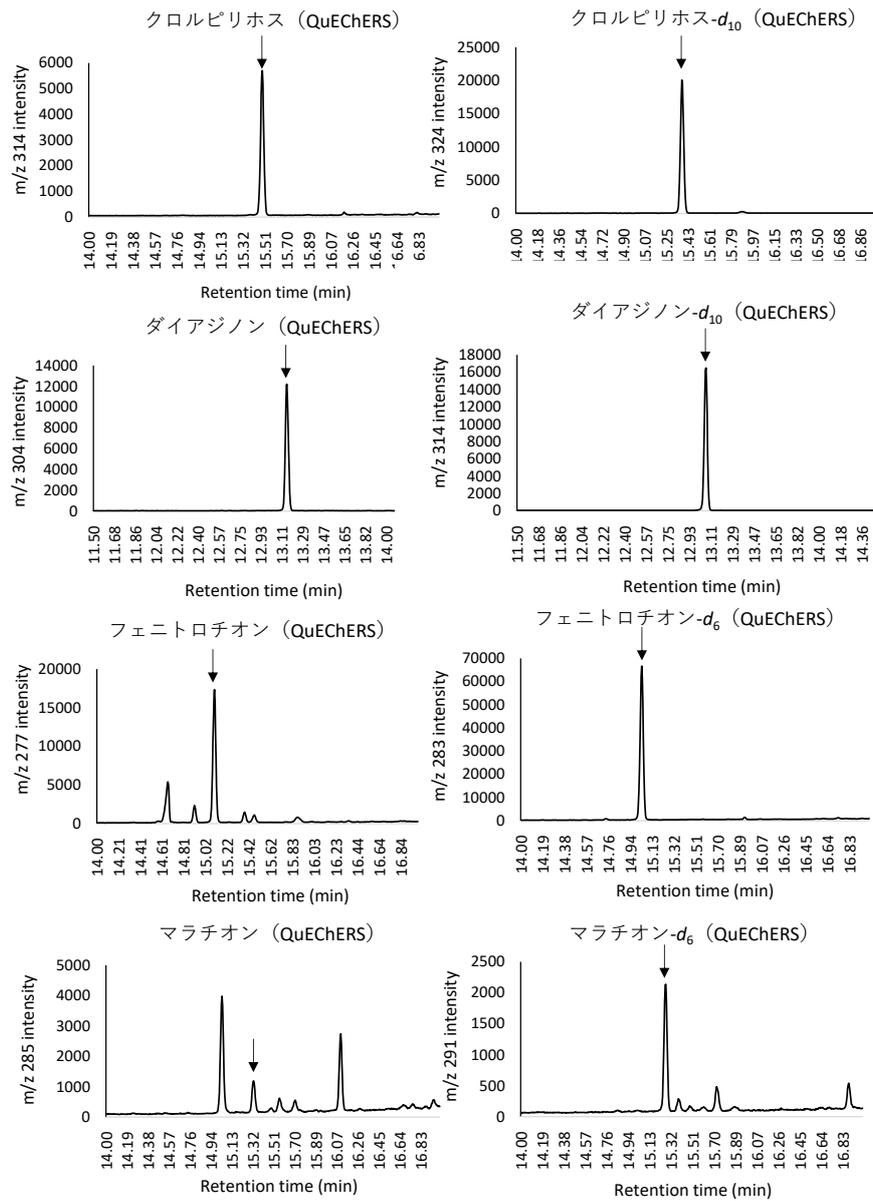


図 2 QuEChERS 法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の対象農薬の GC/MS クロマトグラム

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

### 誌上発表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
竹林純、高坂典子、鈴木一平、中阪聡亮、平林尚之、石見桂子、梅垣敬三、千葉剛、 <u>渡辺卓穂</u>	食品中の栄養成分検査の技能試験 (2017-2018)	食品衛生学雑誌	61	63-71	2020

### 学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
<u>渡辺卓穂</u>	技能試験（残留農薬検査）について	第43回日本農薬学会農薬残留分析研究会（Web開催）	2020
大竹貴光	農薬残留分析における精度管理—技能試験と認証標準物質の活用および不確かさの導入	第43回日本農薬学会農薬残留分析研究会（Web開催）	2020
岡元千明、今井浩一、吉田栄充、石井里枝、根本了、 <u>穂山浩</u>	LC-MS/MS を用いた農産物中のプロピリスルフロン分析法の検討	第57回全国衛生化学技術協議会年会（誌上・Web開催）	2020
池田真希、久保田佳子、八木真美、佐藤夏岐、西垣嘉人、平林尚之、高坂典子、 <u>渡辺卓穂</u>	玄米試料を用いた重金属試験プログラムのパイロットスタディ	日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会（web開催）	2020
若栗忍、佐藤夏岐、 <u>渡辺卓穂</u>	アレルギー物質（小麦タンパク質）を含む特定原材料検査のための技能試験プログラムのパイロットスタディ	日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会（web開催）	2020

その他

厚生労働大臣 殿

機関名 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 小島 幸一



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 公益事業部 ・ 部長  
(氏名・フリガナ) 渡辺 卓穂 (ワタナベ タカホ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

- (留意事項)
- ・ 該当する□にチェックを入れること。
  - ・ 分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 3年 3月 2日

厚生労働大臣 殿

機関名 埼玉県衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本多 麻夫



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 埼玉県衛生研究所 副所長兼食品微生物検査室長  
(氏名・フリガナ) 石井 里枝 イシイ リエ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年3月4日

厚生労働大臣 殿

機関名 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 奥野 良信



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 衛生化学部 食品化学2課 主任研究員

(氏名・フリガナ) 村上 太郎 (ムラカミ タロウ)

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



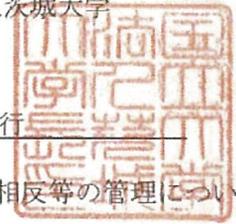
令和3年3月17日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人茨城大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 太田 寛行



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 農学部・准教授  
(氏名・フリガナ) 鎗田 孝・ヤリタ タカシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 3年 3月 25日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人産業技術総合研究所  
所属研究機関長 職名 理事長  
氏名 石村 和彦



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 計量標準総合センター 主任研究員  
(氏名・フリガナ) 大竹 貴光 (オオタケ タカミツ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。